

Photorezeption in *Drosophila melanogaster*:

Die Synchronisation der Inneren Uhr durch  
Mondlicht und die Analyse von Rhodopsin 7 als  
neues Photopigment



**DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER  
NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.) DER  
NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III – BIOLOGIE UND  
VORKLINISCHE MEDIZIN DER UNIVERSITÄT REGENSBURG**

**vorgelegt von**

***Wolfgang Michael Bachleitner***

**aus**

***Rimsting am Chiemsee***

**Januar**

**2008**

**Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am 16.01.2008.**

**Die mündl. Prüfung (Kolloquium) wurde am 13.03.2008 abgelegt.**

**Die Arbeit wurde angeleitet von Prof. Dr. Charlotte Förster**

<b>Prüfungsausschuss:</b>	<b>Prof. Dr. Reinhard Wirth</b>	<b>(Vorsitzender)</b>
	<b>Prof. Dr. Charlotte Förster</b>	<b>(1. Gutachter)</b>
	<b>Prof. Dr. Stephan Schneuwly</b>	<b>(2. Gutachter)</b>
	<b>Prof. Dr. Rosemarie Baumann</b>	<b>(3. Prüfer)</b>

**Veröffentlichungen, die aus dieser Arbeit hervorgingen:**

Projektbeschreibung von Stipendiaten des Graduiertenkollegs (GRK 640) der Deutschen Forschungs Gemeinschaft (DFG): „*Sensory photoreceptors in natural and artificial systems*“ Spektrum der Wissenschaft, Juli 2005

**Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:**

Bachleitner W, Kempinger L, Wulbeck C, Rieger D, Helfrich-Forster C. (2007)  
Moonlight shifts the endogenous clock of *Drosophila melanogaster*. PNAS  
104(9):3538-43.

**Meinem Vater gewidmet...**

† 18.01.2004



## **Inhaltsverzeichnis**

### **I. Allgemeine Einleitung**

<b>1. Einführung.....</b>	<b>5</b>
<b>2. Die Grundorganisation von Inneren Uhren.....</b>	<b>6</b>
<b>3. <i>Drosophila melanogaster</i> als circadianer Modellorganismus.....</b>	<b>7</b>
<b>3.1. Photorezeption: Das visuelle System von <i>D. melanogaster</i>.....</b>	<b>8</b>
<b>3.2. Die Innere Uhr von <i>D. melanogaster</i>.....</b>	<b>12</b>
3.2.1. Der molekulare Mechanismus des circadianen Oszillators.....	13
3.2.2. Die neuronalen Grundlagen des circadianen Systems.....	14
3.2.3. Das „Zwei-Oszillatoren-Modell“ von Pittendrigh und Daan.....	17
<b>4. Überblick über die Teilprojekte der Dissertation.....</b>	<b>17</b>

### **II. Teil 1: „Mondlichtprojekt“**

<b>1. Einleitung.....</b>	<b>20</b>
1.1. Der Einfluss von Tages- bzw. Mondlicht auf die Aktivitätsrhythmik.....	20
1.2. Ziele des Mondlichtprojekts.....	21
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>22</b>
<b>2.1. Nährmedium und Aufzuchtbedingungen.....</b>	<b>22</b>
<b>2.2. Fliegenstämme.....</b>	<b>22</b>
<b>2.3. Verhaltenstests.....</b>	<b>22</b>
2.3.1. Wahl des Lichtprogramms.....	23
2.3.2. Analyse der Lokomotorrhythmik.....	24
<b>2.4. Immunhistochemie.....</b>	<b>25</b>
2.4.1. Antikörperfärbung und Präabsorption des polyclonalen PER-Serums.....	25
2.4.2. Quantifizierung der Antikörperfärbung, konfokale Lasermikroskopie.....	26

<b>2.5. Westernblot.....</b>	<b>26</b>
<b>2.6. Statistik.....</b>	<b>27</b>
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>28</b>
<b>3.1. Der Einfluss des Mondlichts auf das Verhalten von <i>D. melanogaster</i>.....</b>	<b>28</b>
3.1.1. Analyse des Laufverhaltens in LD, LM, MM und DD-Zyklen.....	28
<b>3.2. Rhodopsine sind die „Mondlichtphotorezeptoren“ .....</b>	<b>30</b>
<b>3.3. Der Einfluss des Mondlichts auf die Innere Uhr.....</b>	<b>31</b>
3.3.1. Überprüfung der „peripheren Oszillatoren“ im Komplexauge.....	31
3.3.2. Veränderungen in den lateralen und dorsalen Uhrneuronen im Zentralgehirn .....	32
3.3.2.1. Reduktion der PER- und TIM-Proteinmenge.....	32
3.3.2.2. Der Effekt von Mondlicht auf die Phasenlage des Morgen- und Abendoszillators.....	33
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>39</b>
<b>4.1. Durch nächtliches Mondlicht provozierte Nachtaktivität von Taufliegen         ist nicht nur ein Ausdruck von Lichtpräferenz.....</b>	<b>39</b>
<b>4.2. Die Bedeutung der Lichtsensitivität der Photorezeptoren und des         circadianen Systems .....</b>	<b>40</b>
<b>4.3. Die Relevanz einer flexiblen Inneren Uhr bei sich verändernden,         natürlichen Lichtverhältnissen: Unterstützung für das         „Zwei-Oszillatoren-Modell“ von Pittendrigh und Daan.....</b>	<b>42</b>
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>44</b>

### **III. Teil 2: „Rhodopsin 7-Projekt“**

<b>1. Einleitung.....</b>	<b>46</b>
1.1. Das Protein Rhodopsin 7 (RH 7) von <i>Drosophila melanogaster</i> .....	46
1.2. RH 7– der unbekannte Photorezeptor der Dorsalen Neurone?.....	47
1.3. Ziele des Rhodopsin 7-Projekts.....	49
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>51</b>
<b>2.1. Material.....</b>	<b>51</b>
2.1.1. Verbrauchsmaterialien und Chemikalien.....	51
2.1.2. Mikroorganismen und Fliegenstämme.....	51
2.1.3. <i>Drosophila</i> -Aufzuchtmedium.....	53
2.1.4. Aufzuchtmedien für Bakterien.....	53
2.1.5. Oligonukleotide, Konstrukte und Antikörper.....	53

<b>2.2. Genetische Methoden.....</b>	<b>54</b>
2.2.1. Das UAS-Gal4-System.....	54
2.2.2. Keimbahntransformation und Herstellung genetisch stabiler Transformanten.....	55
2.2.3. Herstellung der knock-out Mutante durch <i>P-Element</i> Remobilisierung.....	56
2.2.4. Etablierung einer doppelt homozygoten Linie des <i>Rh1-Rh7</i> -Konstrukts im <i>ninaE</i> -Hintergrund.....	57
<b>2.3. Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>57</b>
2.3.1. Allgemeines.....	57
2.3.2. Klonierung und Isolierung der Plasmid-DNA aus Bakterien.....	57
2.3.3. „Single fly“ gDNA-Isolierung.....	58
2.3.4. RNA-Isolierung und Reverse Transkription.....	58
2.3.5. Polymerase Chain Reaktion (PCR).....	58
2.3.6. Gelelektrophorese und Nukleinsäureaufreinigung.....	59
2.3.7. Sequenzierung.....	59
2.3.8. Deletionskartierung.....	60
2.3.9. Western Blot (Semidryblot).....	60
<b>2.4. Immunohistochemie und histologische Methode.....</b>	<b>60</b>
2.4.1. Antikörperfärbung an wholemount-Fliegenhirnen.....	60
2.4.2. Antikörperfärbung an Kryostatschnitten.....	61
2.4.2.1. Quantifizierung der Antikörperfärbung.....	61
2.4.3. Präparation und Färbung von Semidünnschnitten.....	61
2.4.3.1. Bewertung der retinalen Degeneration.....	62
<b>2.5. Verhaltenstests.....</b>	<b>63</b>
2.5.1. Wahl der unterschiedlichen Lichtprogramme.....	63
2.5.2. Auswertung der Lokomotoraktivität.....	65
<b>2.6. Elektroretinogramm (ERG)-Analyse.....</b>	<b>65</b>
<b>2.7. Datenbanksuche.....</b>	<b>66</b>
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>67</b>
<b>3.1. Die Etablierung transgener Linien und Rh7 Mutanten zur Funktionsanalyse des RH7-Proteins.....</b>	<b>67</b>
3.1.1. Herstellung transgener Linien und von Rh7-Mutanten.....	67
3.1.2. Charakterisierung der transgenen Linien und der Rh7-Mutante.....	68
3.1.2.1. Bestätigung der Überexpression des RH7-Proteins durch Western Blot-Analyse.....	68
3.1.2.2. Verifizierung der Rh7-Mutante durch Sequenzanalysen und Deletionskartierung.....	69
<b>3.2. Bestimmung des RH7-Expressionsmusters.....</b>	<b>71</b>
3.2.1. Expressionsanalyse von RH7 durch Rh7-Gal4/UAS-GFP Linien.....	71
3.2.1.1. Bestimmung des RH7-Expressionsmusters mit Antikörpern im Wildtyp.....	74
3.2.1.2. Spezifizierung der Antikörperfärbung mit Hilfe der transgenen Linien und der RH7-Mutante.....	76
<b>3.3. Funktionsanalyse des RH7-Proteins in der Tauf liege.....</b>	<b>77</b>
3.3.1. Rolle von RH7 als funktioneller Photorezeptor in der Tauf liege.....	77

3.3.1.1. „Rescue-Effekt“: Die Rh1-Rh7-Überexpression verhindert die Photorezeptordegeneration in der Linie <i>yw;Rh1-Rh7;ninaE</i> .....	77
3.3.1.2. ERG-Studien stützen die Annahme zur Fähigkeit der Photorezeption von RH7 in <i>yw;Rh1-Rh7;ninaE</i> .....	81
3.3.2. Analyse von Verhaltensexperimenten zur Charakterisierung der Rolle von RH7 in der circadianen Rhythmik.....	82
3.3.2.1. Simulation der Dämmerung.....	83
3.3.2.2. Rotlicht-Shiftexperiment zum Test des Resynchronisationsverhaltens.....	87
3.3.2.3. Dauerrotlichtexperiment zur Charakterisierung der Rolle von RH7 als Rotlichtrezeptor.....	102
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>108</b>
<b>4.1. RH7 ist ein Photorezeptor in <i>D. melanogaster</i>.....</b>	<b>108</b>
4.1.1. ERG-Studien bezeugen die Funktionalität von RH7 als Photopigment.....	108
4.1.2. RH7 in R1-6 rettet den Phänotyp der Augen in <i>yw;Rh1-Rh7;ninaE</i> -Fliegen.....	109
4.1.3. Verhaltensexperimente bestätigen die Funktionalität von RH7 als Photorezeptor.....	110
<b>4.2. Analyse des Expressionsmusters von RH7.....</b>	<b>110</b>
4.2.1. Hinweise auf ein geringes Expressionsniveau von RH7 im Wildtyp.....	110
4.2.2. Untersuchung der Lokalisation der RH7-Expression.....	111
<b>4.3. Die Rolle von RH7 als circadianer Photorezeptor.....</b>	<b>113</b>
4.3.1. Beschreibung des Phänotyps der RH7 knock-out Mutante.....	113
4.3.2. Die Funktion von RH7 in der Rotlichtsensorik.....	114
<b>4.4. Ist RH7 ein Melanopsin-ähnlicher Photorezeptor in <i>D. melanogaster</i>?.....</b>	<b>118</b>
<b>4.5. Ausblick.....</b>	<b>122</b>
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>123</b>
<b>IV. Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>125</b>
<b>V. Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>127</b>
<b>VI. Glossar.....</b>	<b>128</b>
<b>VII. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>130</b>
<b>VIII. Danksagung.....</b>	<b>141</b>
<b>IX. Erklärung.....</b>	<b>142</b>

## **I. Allgemeine Einleitung**

### **1. Einführung**

Jeder Organismus auf der Erde ist tagtäglich teils stark variierenden Umwelteinflüssen, wie z.B. der Temperatur, Luftfeuchtigkeit und den sich ändernden Lichtverhältnissen ausgesetzt. Einzig die Veränderung der Helligkeit, also der Wechsel von Tag und Nacht, bedingt durch die Drehung der Erde um ihre eigene Achse auf der Bahn um die Sonne, ist tatsächlich vorhersagbar. Eine aktive Abstimmung der Körperfunktionen und der Verhaltensleistungen des Organismus durch Vorbereitung an diesen konstanten Umwelteinfluss stellt einen entscheidenden selektiven Vorteil dar, da der Organismus dadurch nicht erst unvorbereitet auf diesen äusseren Reiz reagieren muss. Im Lauf der Evolution haben Organismen daher sog. Innere Uhren entwickelt, endogene Systeme, die den Tagesablauf nahezu aller rezenten Organismen steuern. Absolut lebensnotwendig sind Innere Uhren nicht, da auch Organismen mit genetisch zerstörten Uhren lebensfähig sind. Dass eine gut funktionierende Uhr aber die biologische Fitness steigert, und daraus ein entscheidender Evolutionsvorteil resultiert, wurde eindrucksvoll in Konkurrenzversuchen mit Cyanobakterien gezeigt. Der Stamm, dessen endogene Periode besser mit dem externen Zeitgeber (Licht-Dunkel-Wechsel) synchronisiert war, dominierte über den „schlechter angepassten“ Stamm und überwuchs diesen (Ouyang et al., 1998).

Durch Zufall wurde im 18. Jahrhundert der Weg für ein bedeutendes Forschungsgebiet, die sog. „Chronobiologie“ (griechisch, bedeutet „die Lehre von Zeit und Leben“) geebnet. Aufgrund von Platzmangel in seinem Arbeitszimmer steckte der französische Astronom *de Mairan*, seine Pflanze, eine Mimose (*Mimosa pudica*), kurzerhand in ein dunkles Abteil seines Schreibtisches. Erstaunt darüber, dass bei der Pflanze mehrtägige tagesrhythmische Blattbewegungen trotz monotoner Dunkelheit im Schrank zu beobachten waren, begann *de Mairan* experimentell diesem Phänomen auf den Grund zu gehen. Das Resultat war eine erste Beschreibung eines endogenen, circadianen Rhythmus bei Pflanzen im Jahre 1729. Berühmt ist heute noch die „Blumenuhr“ von Carl von Linné, gepflanzt 1745 in Uppsala (Schweden). Kunstvoll arrangierte er die Pflanzung von Blumen in Abhängigkeit von den artspezifischen Blütenöffnungszeiten in Form eines Ziffernblattes um anhand der offenen Blüten die Tageszeit abschätzen zu können. Durch die Forschungsarbeit u.a. von Wilhelm Pfeffer, Erwin Bünning und Karl v. Frisch konnte gezeigt werden, dass sowohl Pflanzen als auch Tiere stabile endogene Rhythmen besitzen.

Auch wir Menschen besitzen eine Innere Uhr, an die wir leidvoll erinnert werden, wenn die Innere Uhr durch unser künstlich geschaffenes Tag- Nacht-Umfeld (künstliche Lichtquellen) in den Konflikt mit dem natürlichen Tagesrhythmus gerät. Konzentrationsstörungen, verlangsamtes

Reaktionsvermögen und Müdigkeit, wie sie z. B. beim Jetlag auftreten, sind direkte Folgen dieser gestörten Rhythmik, und zu einem sehr hohen Anteil sind Verkehrsunfälle oder Katastrophen (wie dem Tankerunglück der *Exxon Valdez* im Jahre 1989 vor Alaskas Küste oder der Explosion im Atomkraftwerk Tschernobyl im Jahre 1986), die „durch menschliches Versagen“ verschuldet wurden, auf diese Symptomatik zurückzuführen. In der heutigen Zeit wird nicht zuletzt die Dimension der negativen Auswirkungen auf die Gesellschaft an wirtschaftlichen Schäden gemessen: der Regensburger Schlafforscher Jürgen Zuley beziffert die Folgekosten des fatalen Schlummerns am Arbeitsplatz auf bis heute weltweit geschätzte 400 Mrd. \$. Doch nicht nur Müdigkeit am Arbeitsplatz, auch schwerwiegendere chronische Folgen für unsere Gesundheit wie Depressionen Magengeschwüre, Herzleiden und ein erhöhtes Krebsrisiko wurden beschrieben (Knutson 2003, Drake et al., 2004). Diese Fakten vermitteln einen Eindruck, wie sensibel dieses System der Inneren Uhr auf äusserliche Störungen reagiert und welche weitreichenden Auswirkungen diese auf den Organismus haben können. Grund genug, diesen komplizierten Mechanismus dieses endogenen Systems besser zu verstehen, um durch erweitertes Verständnis Leiden vorzubeugen bzw. durch moderne chronopharmakologische Ansätze diese zu therapieren.

## 2. Die Grundorganisation von Inneren Uhren

Zur zeitgerechten Anpassung des Lebewesens an die Aussenwelt muss dieses endogene System zwei grundlegende Eigenschaften aufweisen: Das System muss eine stabile Eigenschwingung besitzen und muss diese mit der 24h-Periodik der Umwelt synchronisieren können (Moore-Ede et al., 1982). Essentiell für die Abstimmung der Inneren Uhr mit der Periode der Umwelt ist die Synchronisation der Phasenlage an externe Faktoren (sog. „Zeitgeber“). Der wichtigste Zeitgeber ist Licht, bzw. der tageszeitlich bedingte Licht- Dunkel-Wechsel (Helfrich-Förster, 2002). Aber auch Temperatur und Einflüsse wie Luftfeuchtigkeit und soziale Kontakte sind Faktoren, die das „Stellen“ der Inneren Uhr mitbeeinflussen (Pittendrigh et al., 1958; Levine et al., 2002a). Tagtäglich muss dieser endogene Oszillator, der wie im technischen Sinne als Uhrwerk funktioniert, neu an den 24h- Tagesrhythmus angepasst werden, da die Periodenlänge ( $\tau$ ) der Eigenschwingung der Oszillation unter konstanten Bedingungen (sog. Freilauf) von exakt 24h abweicht, und z.B. beim Menschen 24,8h beträgt (Aschoff et al., 1971). Diese tägliche funktionierende Abstimmung mit den Umweltfaktoren gewährt den Vorteil, den Organismus stets ideal mit dem Tagesrhythmus zu synchronisieren, und damit sensibel auf z.B. jahreszeitliche Veränderungen der Zeitgebereinflüsse reagieren zu können. Die Signale des endogenen Oszillators beeinflussen die physiologischen Abläufe im Organismus und damit nachhaltig metabolische Prozesse bzw. das Verhalten.

Eine weitere essentielle Eigenschaft des circadianen Systems ist, dass der endogene Oszillator „temperaturkompensiert“ ist (Pittendrigh und Bruce, 1957). Das bedeutet, dass Temperaturschwankungen der Umwelt nicht die Periodenlänge des endogenen Oszillators verändern, obwohl die Geschwindigkeit biochemischer Prozesse eigentlich stark von der Temperatur abhängt und damit die Periodenlänge beeinflusst werden müsste. Die Innere Uhr ist jedoch in der Lage, die Periodenlänge über einen weiten Temperaturbereich relativ konstant zu halten (Pittendrigh und Bruce, 1957).

Zusammengefasst kann der Mechanismus des circadianen Systems in drei funktionelle Bereiche gegliedert werden:

**INPUT** (Wahrnehmung der exogenen Zeitgeber der Umwelt)

**ENDOGENER OSZILLATOR** (temperaturkompensiertes „Uhrwerk“)

**OUTPUT** (messbare rhythmische Prozesse, z.B. Metabolismus, Verhalten)

### 3. *Drosophila melanogaster* als circadianer Modellorganismus

War es den „frühen“ Chronobiologen nur vergönnt, die beobachteten Phänomene zu beschreiben, gelang durch Einsatz molekularer und genetischer Studien vor rund 30 Jahren der Durchbruch zum Verständnis der Grundeigenschaften Innerer Uhren. Dieser Prozess wurde in der Wissenschaft von S. Reppert als „Clockwork Explosion“ bezeichnet (Helfrich-Förster, 2002). Benzer und Konopka (1971) blieb es vorbehalten, die ersten Rhythmusmutanten in *Drosophila melanogaster* nach Durchführung eines Mutagenese-„Screens“ zu isolieren. Sie konnten zeigen, dass durch Punktmutationen im *period*-Gen die Periodenlänge der Schlüpfrythmik bzw. Lokomotorrhythmik betroffen wurde. Diese wurde verlängert (*per<sup>L</sup>*), oder verkürzt (*per<sup>S</sup>*), bzw. eine Mutation führte sogar zur Arrhythmie (*per<sup>01</sup>*). Zu Zeiten dieser Experimente war die zu den *Dipteren* gehörende Fliege *Drosophila melanogaster* ein bereits in der Biologie etablierter Modellorganismus, da einfache, billige Zuchtbedingungen, hohe Reproduktionsraten, eine schnelle Generationszeit (~ 12 Tage) für die Arbeit mit diesen Tieren viele Vorteile bietet. Darüberhinaus weist *Drosophila* eine sehr gute genetische Zugänglichkeit auf. Umso mehr gewinnt die Arbeit mit diesem Organismus an Bedeutung, seitdem das Genom (bestehend aus etwa 13 500 Genen auf 4 Chromosomen) sequenziert wurde (Adams et al., 2000). Bei *Drosophila melanogaster* kann mit nur geringem Aufwand eine mögliche Rolle noch unbekannter Gene/Proteine in der circadianen Rhythmik *in vivo* durch Analyse des Lokomotorverhaltens

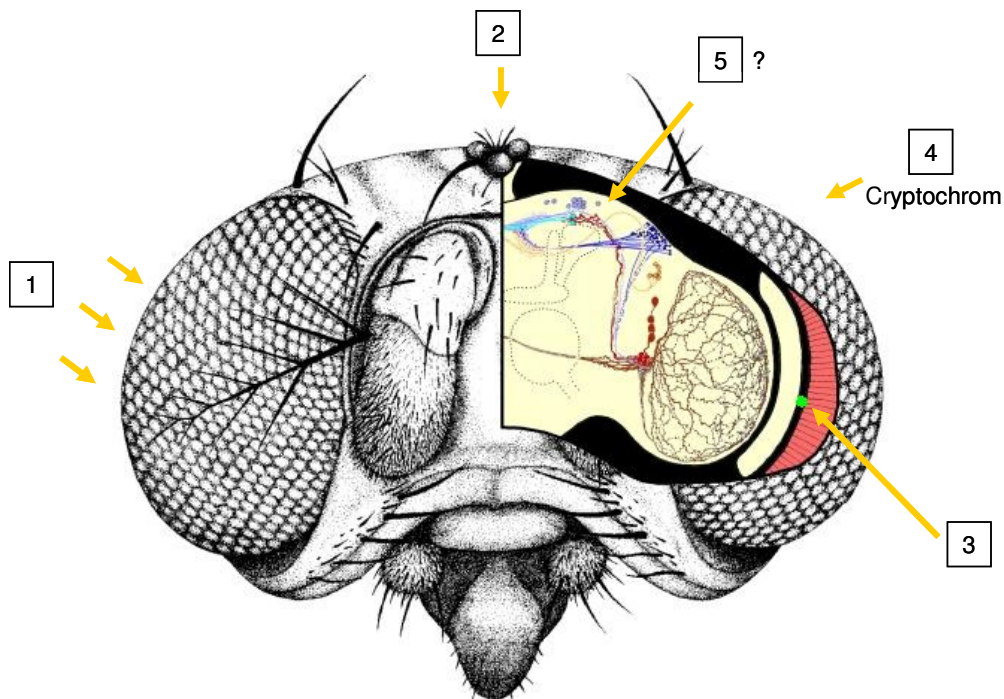
getestet werden. In den nächsten Kapiteln sollen die drei funktionellen Bereiche des circadianen Systems der Taufliege- *Input* (durch Photorezeption), *endogener Oszillator* und *Output*- im Besonderen vorgestellt werden.

### 3.1. Photorezeption: Das visuelle System von *D. melanogaster*

Das photorezeptorische System adulter Taufliegen besteht aus:

- paarig angelegten Komplexaugen mit 5 Rhodopsinen als Photopigmente
- drei Ocellen mit einem Rhodopsin als Photopigment
- extraretinalen Photorezeptoren, den sog. Hofbauer-Buchner Äuglein mit eventuell 2 Rhodopsinen als Photopigmente
- dem Photopigment Cryptochrom, und
- einem unbekannten Photorezeptorpigment, das vermutlich in den Uhr-Gen exprimierenden Dorsalen Neuronen lokalisiert ist (Helfrich-Förster et al., 2001, Veleri et al., 2003).

Die Rezeptororgane bzw. Photopigmente sind im Kopfbereich von *D. melanogaster* lokalisiert (siehe Abb. 1).

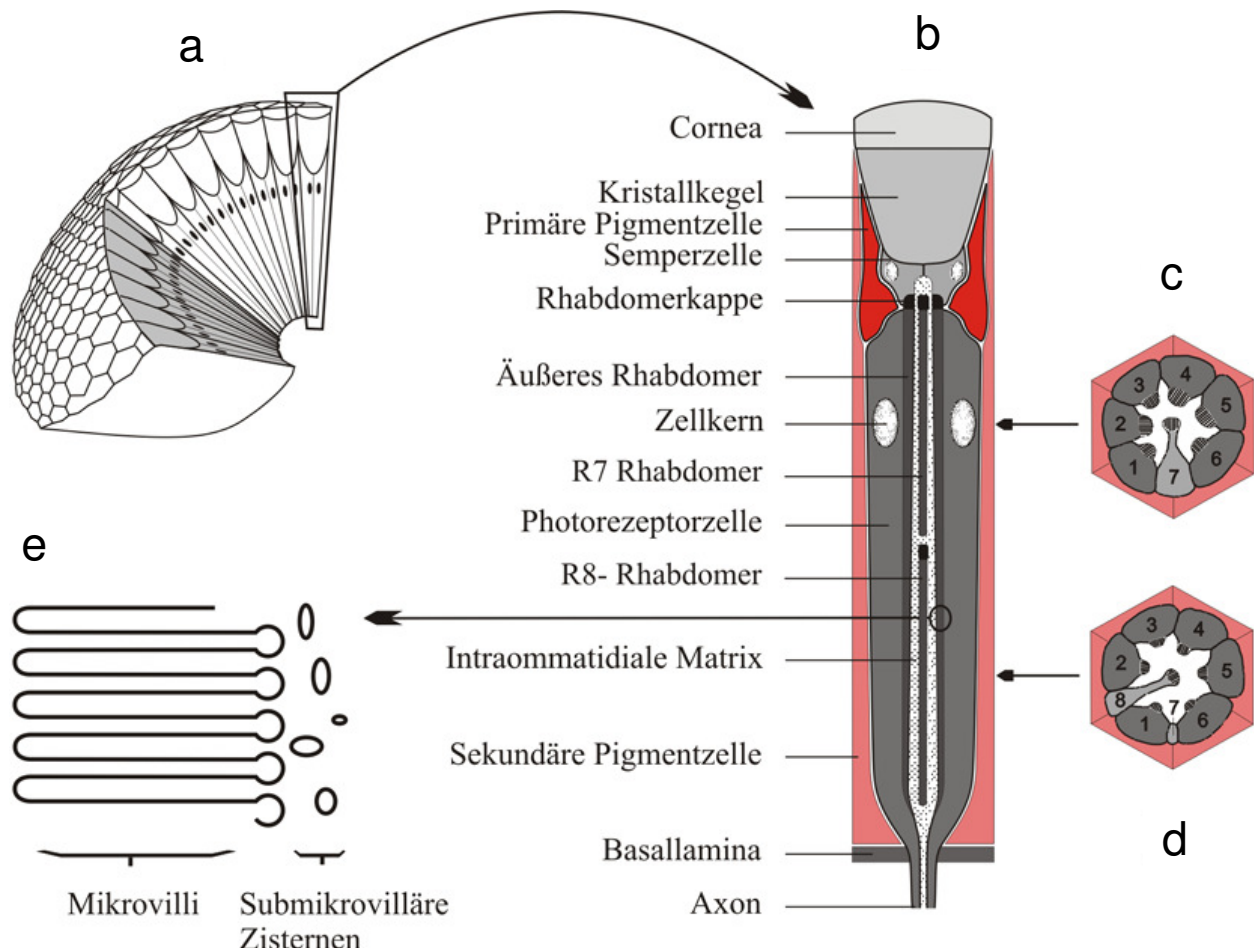




**Abb. 1: Frontalansicht eines Kopfes von *D. melanogaster* mit schematisierter Lage der Photorezeptoren.**

Linke Hemisphäre: Blick auf das Gehirn nach Entfernen der Schädelkapsel. Nähere Erläuterungen der im Gehirn eingezeichneten Neurone: siehe Kapitel 3.2.2. Die gelben Pfeile symbolisieren die Lichteingänge der Photorezeptoren. **1.** Paarig angelegte Komplexaugen **2.** Ocellen **3.** Hofbauer-Buchner Äuglein (grüner Punkt) **4.** Das Photopigment Cryptochrom, (lokalisiert in einigen Uhr-Gen exprimierenden Neuronen) **5.** ein unbekannter Photorezeptor (vermutlich in den Uhr-Gen exprimierenden Dorsalen Neuronen). Nähere Erläuterungen siehe Text. (Grafik: modifiziert nach Helfrich-Förster).

Die **Komplexaugen** bestehen aus rund 800 Einzelaugen, den Ommatidien (Zucker et al., 1987; Wolff and Ready, 1993; Montell, 1999). Jedes Ommatidium besteht aus 20 Zellen, darunter 8 Photorezeptorzellen sowie primäre und sekundäre Pigmentzellen, welche die Ommatidien optisch gegeneinander abschirmen (Abb. 1 und 2). Das Ommatidium, etwa 85µm lang, besteht apikal aus dem dioptrischen Apparat (Cornea und Kristallkegel). Proximal wird es von der Basallamina abgegrenzt, woran sich die optischen Ganglien Lamina und Medulla anschliessen (Hardie 1985 und 1986; Montell, 1999). Die Rezeptorzellen bilden längsseitig, zum Zentrum des Ommatidiums gerichtet, einen Mikrovillisaum aus, der Rhabdomer genannt wird. In der rhabdomerischen Membran sind die Photopigmente, die Rhodopsine lokalisiert. Durch extrazelluläre Matrix sind die Rhabdomere voneinander getrennt und nicht verschmolzen, was als „offenes Rhabdom“ bezeichnet wird (Abb. 2). In charakteristischer Weise sind die Rhabdomere der Rezeptorzellen (R) angeordnet: R1-6 bilden ein hexagonales Muster und liegen peripher und erstrecken sich über das ganze Ommatidium (Abb. 2). In deren Zentrum liegen R7 und R8 übereinander und bilden ein zentrales Rhabdomer (Hardie 1985; Montell, 1999).



**Abb. 2: Aufbau des Komplexauges und der Ommatidien von *D. melanogaster*.**

(a) Übersicht über den Aufbau des Komplexauges aus Ommatidien. (b) Längsschnitt durch ein Ommatidium mit Bezeichnung der Strukturen. (c) und (d): Querschnitt durch ein Ommatidium auf Höhe R7 bzw. R8. (e) Mikrovilli, Aufbau der Membran der Rhabdomere. (Quelle: modifiziert nach Meyer, 2005)

Die zentralen Photorezeptorsellen R7 und R8 unterscheiden sich morphologisch wie auch funktionell von den R1-6. In den R1-6, die nur Rhodopsin 1 (Rh1) enthalten, wird die Funktion des Bewegungssehens erfüllt (Zuker et al., 1985; O'Tousa et al., 1985). Die Zellen R7 und R8 exprimieren insgesamt die 4 Rhodopsine Rh3, Rh4, Rh5 und Rh6 (Zuker et al., 1987; Montell et al., 1987; Chou et al., 1996; Salcedo et al., 1999). Das Expressionsmuster dieser Rhodopsine variiert, und ist abhängig von verschiedenen Subtypen von Ommatidien, die entweder Rh3 in R7 und Rh5 in R8 oder die Kombination Rh4/Rh6 in R7-8 aufweist (Chou et al., 1996; Huber et al., 1997). Das Farbsehen wird durch die R7-8 gewährleistet und durch die Varianz in der Rhodopsinexpression optimiert. Die Wahrnehmung polarisierten Lichtes wird in einem spezialisierten Teil des Komplexauges, der dorsalen Rinne durch Expression von Rh3 in R7 und R8 ermöglicht. (Salcedo et al., 1999; Morante und Desplan, 2004).

Die Axone der R1-6 projizieren von der Retinula ins erste optische Ganglion, die Lamina, wo sie verschaltet werden. Von dort aus ziehen die Axone dann weiter in die Medulla, das zweite optische Ganglion. Im Unterschied zu R1-6 ziehen die Projektionen von R7 und R8 direkt bis in die Medulla und innervieren das Medullaneuropil.

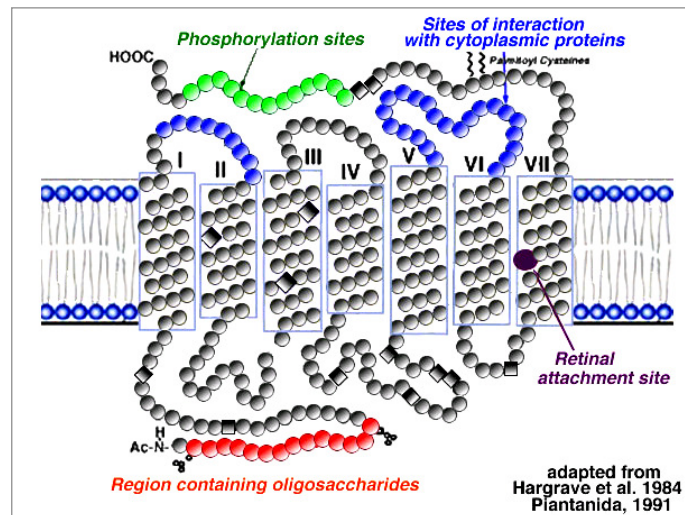
In den **Ocellen**, drei auf der Stirn des Fliegenkopfes lokalisierte photorezeptive Organe, wird nur das Photopigment Rh 2 exprimiert (Abb. 1). Es gibt jedoch keine Information über die genaue Funktion dieser Photorezeptoren (Cowman et al., 1986; Pollock und Benzer 1988)

Die sog. **Hofbauer-Buchner Äuglein** (H-B Äuglein) sind eine Gruppe aus je 4 Rezeptorzellen, die extraretinal zwischen der Retina und dem ersten optischen Ganglion, der Lamina liegen (Abb. 1). Während der Metamorphose entsteht dieser Cluster aus dem sog. Bolwig-Organ, dem aus 12 Zellen bestehenden visuellen Organ der Larve (Hofbauer und Buchner, 1989; Helfrich-Förster et al., 2002).

Der circadiane Blaulichtrezeptor **Cryptochrom** (CRY, Stanewsky et al., 1998) ist ein Flavoprotein, das extraretinal im Gehirn der Taufliege in den Uhrneuronen exprimiert wird (Cashmore, 1999; Helfrich-Förster, 2002). Neueste Erkenntnisse zeigen, dass CRY in folgenden Uhrneuronen exprimiert wird: In 3 Zellen der LN<sub>d</sub>, 8 DN<sub>1</sub>, und allen LN<sub>v</sub>'s (T. Yoshii et al., in press). Eine bedeutende Funktion vom rhythmisch transkribierten CRY liegt in der Synchronisation des molekularen Oszillators mit dem Zeitgeber Licht (Emery et al., 2000; Ceriani et al., 1999).

Es bestehen Hinweise, dass ein **unbekannter Photorezeptor** wahrscheinlich in den Uhr-Gen exprimierenden Dorsalen Neuronen existiert, da nach Eliminierung der Signale von Rhodopsinen und Cryptochrom die Synchronisation und auch Resynchronisation dieser Fliegen zu LD-Zyklen gewährleistet ist (Stanewsky et al., 1998; Emery et al., 2000b; Helfrich-Förster et al., 2001; Veleri et al., 2003).

In diesem Abschnitt soll noch im Besonderen auf die Photopigmente der Komplexaugen, Ocellen und des H-B-Äugleins eingegangen werden, die **Rhodopsine**. Rhodopsine sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR's), deren Apoprotein, das Opsin, die rhabdomerische Membran mit 7 hydrophoben  $\alpha$ -Helices durchzieht, die durch jeweils drei abwechselnd intra- und extrazelluläre Schleifen verbunden sind (siehe Abb. 3). Das Apoprotein bindet den lichtsensitiven Chromophor 11-*cis*-3-Hydroxyretinal (Filipek et al., 2003, Terakita, 2005).



**Abb. 3: Schematische Darstellung eines Rhodopsin-Moleküls.**

Die in die Membran eingebetteten 7 Zylinder (I-VII) repräsentieren die Transmembrandomänen. In der siebten Schleife ist die Bindestelle für den Chromophor, das Retinal angegeben.

Die Absorption einfallender Lichtquanten führt zur Isomerisierung des Chromophors in all-trans-Hydroxyretinal. Dadurch wird die Konformation des inaktiven Rhodopsins verändert und das aktivierte Metarhodopsin entsteht, was die Aktivierung der visuellen Transduktionskaskade zur Folge hat. Das heterotrimere G<sub>q</sub>-Protein wird aktiviert und durch Zerfall des Komplexes wird durch eine  $\alpha$ -Untereinheit das zentrale Effektorprotein der Invertebraten- Transduktionskaskade, die Phospholipase C <sub>$\beta$</sub>  (PLC <sub>$\beta$</sub> ) aktiviert. Nach weiteren Schritten in dieser Kaskade führt letztendlich die Öffnung von Kationenkanälen (TRP und TRPL) zum Einstrom von Kationen in die Photorezeptorzelle und damit zu einem depolarisierendem Rezeptorpotential (O'Tousa et al., 1985; Montell und Rubin, 1989; Montell, 1999; Hardie und Raghu, 2001).

Die spezifischen spektralen Empfindlichkeiten der bisher bekannten Rhodopsine 1-6 von *D. melanogaster* beruhen auf Strukturunterschieden vor allem in der dritten cytoplasmatischen Schleife bzw. dem C-terminalen Ende dieser jedoch sehr homologen Moleküle. Die maximale Empfindlichkeit der unterschiedlichen Rhodopsine liegt bei: 486nm (Rh1), 418nm (Rh2), 331nm (Rh3), 355nm (Rh4), 442nm (Rh5) und 515nm (Rh6) (Salcedo et al., 1999).

### 3.2. Die Innere Uhr von *D. melanogaster*

Die Innere Uhr der Taufliede gilt als eines der besterforschten Uhr-Systeme in der Wissenschaft (Helfrich-Förster, 2002; Hall, 2005). Es ist bekannt, dass bedingt vor allem durch die täglichen Licht-Dunkel-Wechsel Oszillationen von Uhr-Proteinen in den sog. Uhrneuronen erzeugt werden. Diese Neuronen, die auf beiden Hemisphären des Gehirns angeordnet sind, sind durch

Projektionen in einem neuronalen Netzwerk verschaltet (Zerr et al., 1990; Helfrich-Förster et al., 2007). Die Grundprinzipien des molekularen Mechanismus der Inneren Uhr sowie die Bedeutung der neuronalen Organisation der Schrittmacherzentren, die nachhaltig den Aktivitätsrhythmus generieren, sollen in den folgenden Abschnitten erläutert werden.

### 3.2.1. Der molekulare Mechanismus des circadianen Oszillators

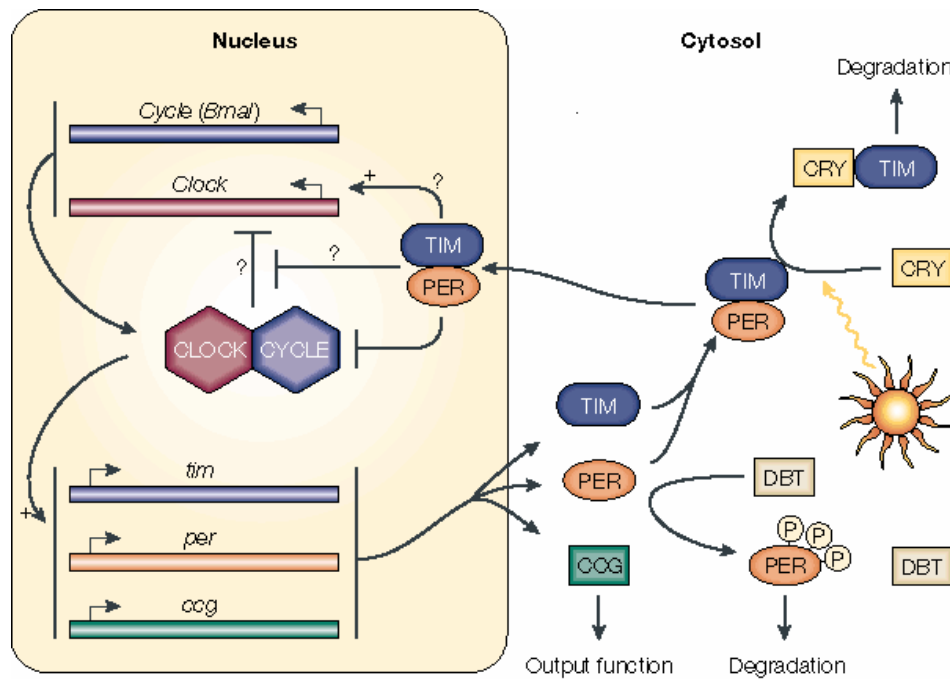
Das Grundprinzip, auf dem der Mechanismus der Inneren Uhr basiert, ist eine negative Rückkopplungsschleife. Das bedeutet, dass nach Transkription eines Gens, und dessen Translation, das Protein selbst wiederum die Transkription des eigenen Gens hemmt.

Zwei negative Rückkopplungsschleifen sind bekannt und beschrieben. Eine weitere, potentielle Rückkopplungsschleife mit einem zentralen Gen (*clockwork orange*, *cwo*), die auch mit diesen beiden Schleifen interagiert, war Gegenstand jüngster Entdeckungen (Lim et al., 2007; Matsumoto et al., 2007).

Nicht nur das *period*-Gen (*per*), das bereits 1971 von Konopka und Benzer Beachtung fand ist von zentraler Bedeutung für die circadiane Rhythmik. Die nach dem heutigen Kenntnisstand wichtigsten Uhr-Gene der ersten Schleife sind darüberhinaus *timeless* (*tim*, Sehgal et al., 1994) und die beiden Transkriptionsfaktoren *Clock* (*Clk*, Allada et al., 1998) und *cycle* (*cyc*, Rutila et al., 1998).

Der molekulare Kreislauf beginnt damit, dass am späten Morgen die Transkription der beiden Gene *per* und *tim* sowie mancher *ccgs* (*clock controlled genes*) durch ein an die Promotorregionen bindendes Dimer der Proteine CLK und CYC aktiviert wird (Allada et al., 1998; Rutila et al., 1998). Die maximale Menge an mRNA von *per* und *tim* ist bei Licht-aus (Zeitgeberzeit (ZT) 12) messbar (So und Rosbash, 1997). Daraufhin beginnt die Translation der beide Proteine. TIM akkumuliert schneller im Cytoplasma als PER, da dieses durch die Kinasen *DOUBLETIME* (DBT) und die *Casein Kinase 2* (CK2, Lin et al., 2002) phosphoryliert wird, und damit dessen Abbau in einem Proteasom aufgrund Markierung durch Ubiquitierung gefördert wird (Grima et al., 2002). Um Mitternacht ist die TIM- Konzentration maximal (Marrus et al, 1996). Durch Heterodimerisierung mit PER wird TIM vor weiterer Phosphorylierung geschützt und somit stabilisiert. Dadurch wird eine zeitliche Verschiebung zwischen mRNA- und Proteinakkumulation erreicht, die notwendig ist für die Funktionalität der negative Rückkopplungsschleife. In einer zweiten Schleife wird die rhythmische Transkription von *Clk* durch den eigenen Repressor von *Clk*, *Vrille* (VRI) und dem Par Domain Protein 1 (PDP1) reguliert (Glossop et al., 1999, 2003; Helfrich-Förster, 2002). Als Heterodimer mit DBT gelangt PER in den Zellkern (Kim und Edery, 2006). Der Import von TIM wird unterstützt durch die Kinase SHAGGY (SGG), die das TIM-Protein phosphoryliert, was wiederum den Kerneintritt gewährleistet (Martinek et al., 2001). Im

Kern erfolgt die Bindung vom Dimer CLK-CYC mit dem Heterodimer PER-TIM. Neben PER wird auch CLK phosphoryliert, was zu einem Abbau der beiden Proteine führt (Yu et al., 2006). Das Grundprinzip des circadianen Oszillators ist in Abbildung 4 schematisch dargestellt.



**Abb. 4 : Vereinfachtes Modell des molekularen, circadianen Oszillators von *D. melanogaster*.**

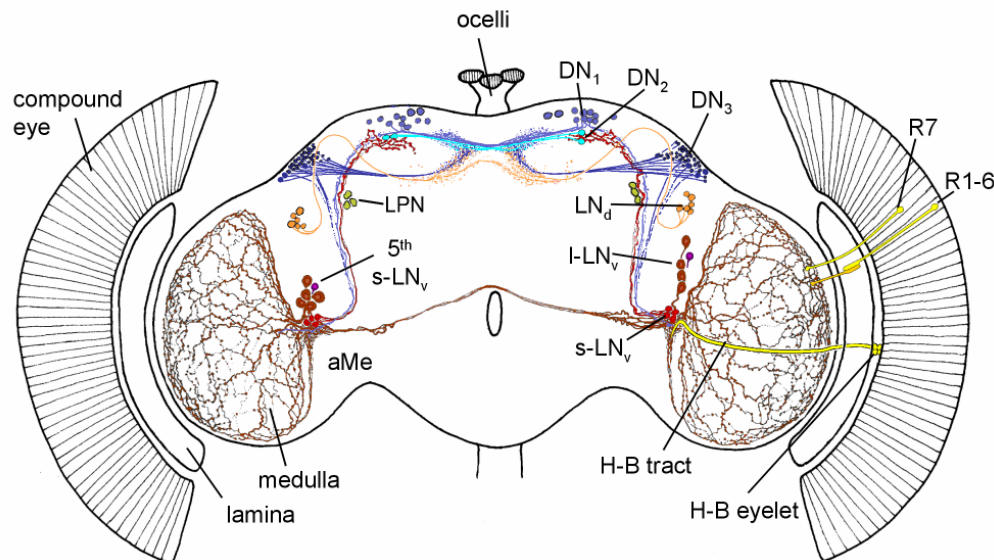
Aus Übersichtsgründen sind nicht alle Komponenten dieses endogenen Systems dargestellt. Erläuterung und Abkürzungen: siehe Text. Schema nach Cermakian und Sassone-Corsi, 2000.

Innerhalb kürzester Zeit nach Licht an (nach ZT 0) nimmt die Konzentration von TIM rasant ab (Myers et al., 1996). Dies basiert auf der Aktivierung von CRY durch Licht. Daraufhin bindet CRY TIM, was zum Abbau in einem Proteasom führt (Helfrich-Förster, 2002; Grima et al., 2002; Kim und Edery, 2006). Der durch Licht bedingt Abbau von TIM bewirkt auch den Abbau von PER. Damit wird die Repression der Transkription der Uhr gene aufgehoben und der Zyklus des negativen Rückkopplungsprozesses kann von neuem starten.

### 3.2.2. Die neuronalen Grundlagen des circadianen Systems

Es sind nur etwa 150 Schrittmachernuronen im Zentralgehirn, die Uhr-Gene exprimieren und das rhythmische Lokomotorverhalten bestimmen (Kaneko und Hall, 2000). Diese werden traditionell in sechs Untergruppen aufgeteilt (siehe Abb. 5). Drei davon liegen dorsal, werden dementsprechend als Dorsale Neuronen 1-3 (DN<sub>1</sub>, DN<sub>2</sub>, DN<sub>3</sub>) bezeichnet, die anderen drei Zellcluster liegen lateral. Diese Lateralen Neuronen werden in eine große (l-LN<sub>v</sub>), eine kleine (s-

LN<sub>v</sub>) und eine dorsale Gruppe (LN<sub>d</sub>) unterteilt (Helfrich-Förster, 2002; 2005; Shafer et al., 2006). Neuerdings wird auch die Gruppe der lateralen posterioren Neurone (LPN) dazugezählt (Shafer et al., 2006).



**Abb. 5 : Schematisierte anatomische Lage der Uhrneuronen im Gehirn von *D. melanogaster*.**

Darstellung der Uhr-Gen exprimierenden Neurone und deren Verschaltungen. Die Uhrneurone werden aufgrund ihrer anatomischen Lage in die Dorsalen Neurone (DN<sub>1</sub>, DN<sub>2</sub>, DN<sub>3</sub>) und die Lateralen Neurone unterteilt (I-LN<sub>v</sub>, s-LN<sub>v</sub>, LN<sub>d</sub>, LPN). Legende: aMe: akzessorische Medulla, H-B: Hofbauer-Buchner, R: Rezeptorzelle. Erläuterungen siehe Text. Schema nach Helfrich-Förster et al., 2007.

Die Gruppe der **Lateralen Neurone** wird als Hauptschrittmacherzellen bezeichnet, da sie notwendig und ausreichend sind, rhythmisches Lokomotorverhalten zu generieren (Peng et al., 2003; Renn et al., 1999; Frisch et al., 1994). Die Zellgruppe der I-LN<sub>v</sub> besteht aus 4-6 Zellen, die alle PDF-positiv (Pigment Dispersing Faktor) sind (Renn et al., 1999). Die Funktion von PDF ist noch nicht komplett verstanden, es ist jedoch bekannt, dass PDF für die Synchronisation bzw. Kommunikation der einzelnen Zellgruppen und für die Aufrechterhaltung rhythmischen Verhaltens unter konstanten Bedingungen wichtig ist (Renn et al., 1999). Die Projektionen der I-LN<sub>v</sub> bilden ein weitverzweigtes Netzwerk auf der Oberfläche beider Medulle und verbinden beide durch Fasern, die entlang des hinteren optischen Trakts ziehen. Das Zellcluster der s-LN<sub>v</sub> fällt dadurch auf, dass eine dieser 5 Zellen kein PDF exprimiert, die 4 anderen jedoch schon. Diese sog. 5. PDF-negative Zelle ist wahrscheinlich entwicklungsbedingt in diesem Cluster, da sie bereits wie die PDF-positiven s-LN<sub>v</sub> im larvalen circadianen System funktionell ist und beide eventuell

aus gemeinsamen Vorläufern entstehen (Kaneko et al., 1997; Rieger et al., 2006; Shafer et al., 2006; Helfrich-Förster et al., 2007).

Bei den LN<sub>d</sub> handelt es sich wahrscheinlich um eine heterologe Zellgruppe, da nur 3 der Zellen CRY exprimieren, die einzelnen Zellen unterschiedliche Projektionen aufweisen, und ihre Oszillationen relativ leicht ausser Phase geraten (Yoshii et al., in press; Rieger et al., 2006; Wülbeck und Helfrich-Förster, in preparation).

Die **Dorsalen Neurone** werden in drei Subgruppen untergliedert, die DN<sub>1</sub>, DN<sub>2</sub> und DN<sub>3</sub>. Diese Neuronengruppen tragen zur circadianen Rhythmizität bei, sind für diese wohl aber nicht zwingend erforderlich (Frisch et al., 1994). Diese Einteilung wurde vor kurzem noch verfeinert, da vermehrt Hinweise auf die Inhomogenität in der Gruppe der DN<sub>1</sub> vorliegen: die DN<sub>1a</sub> (anterior) und DN<sub>1p</sub> (posterior). Von den DN<sub>1a</sub> ist bekannt, dass diese bereits in der Larve existieren, das Neuropeptid IPNamid exprimieren und eine enge Verbindung mit den s-LN<sub>v</sub> haben (Shafer et al., 2006). Die DN<sub>2</sub> bestehen aus 2 Zellen unbekannter Funktion. Die DN<sub>3</sub> sollen möglicherweise eine Funktion in der Lichtsensorik besitzen, bzw. Sitz eines unbekannten Photorezeptors sein, da selbst nach Ablation aller soweit bekannter Lichteingangswege, wie CRY, H-B-Äuglein und Komplexaugen in ihnen die molekularen Oszillationen noch auf Licht-Dunkel-Wechsel synchronisiert werden konnten (Veleri et al., 2003). Die Funktion der erst kürzlich entdeckten LPN's, ist noch nicht genau bekannt, eine Rolle in der Synchronisation auf Temperaturzyklen wird jedoch vermutet (Yoshii et al., 2005; Shafer et al., 2006).

Wie bereits erwähnt wird die Innere Uhr direkt durch den Zeitgeber Licht mit dem Licht-Dunkel-Wechsel (LD) synchronisiert. Dies wird als Mitnahme bzw. Entrainment (engl.) bezeichnet. Die Innere Uhr steuert die Aktivitätsrhythmik über noch unbekannte Wege. Hierbei zeigte sich ein typisches, sog. bimodales Aktivitätsmuster mit zwei Hauptaktivitätsphasen, einer am Morgen und einer am Abend (Hamblen-Coyle et al., 1992; Helfrich-Förster et al., 2000). Dieses Aktivitätsmuster, das prinzipiell für das ganze Tierreich gilt, wird, wie bereits erwähnt, nachhaltig durch Licht über das circadiane Schrittmacherzentrum reguliert. Diese Effekte, sind jedoch nicht die einzigen Lichteinflüsse, die die Aktivitätsrhythmik beeinflussen. Licht kann auch direkt das Aktivitätsmuster eines Organismus beeinflussen. Diese Lichteffekte werden als Masking-Effekte (von engl. „masking“ = maskieren) bezeichnet. Das Aktivitätsprofil, das durch die Innere Uhr gesteuert wird, wird dadurch sozusagen maskiert und verborgen (Mrosovsky, 1999). Der Autor erwähnt jedoch, dass die direkten bzw. indirekten Effekte von Licht auf die Lokomotorrhythmik nicht streng voneinander getrennt sind. Veränderungen im Aktivitätsmuster, die durch direkte Lichteinflüsse hervorgerufen werden, können auch nachhaltig auf den endogenen Oszillator wirken, und somit die Innere Uhr „entrainen“ (Mrosovsky, 1999) Solche Effekte wurden auch bei *Drosophila* gefunden (Rieger et al., 2003).



### 3.2.3. Das „Zwei-Oszillatoren-Modell“ von Pittendrigh und Daan

Es stellt sich die Frage, wie nun dieser bimodale Aktivitätsrhythmus generiert wird.

In jedem Uhrneuron bestehen, wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben, autonome, rhythmische Oszillationen der Uhrproteine. Wie jedoch genau eine Koordination dieser Rhythmen generiert wird, der zu einem synchronisierten, bimodalen Aktivitätsrhythmus des gesamten Organismus führt, ist nicht genau bekannt. Interessanterweise wurde schon vor mehr als 30 Jahren von zwei begnadeten Chronobiologen, Colin Pittendrigh und Serge Daan (1976), ein Modell vorgeschlagen, das eine Erklärung für diese Frage bieten könnte. Die Wissenschaftler postulierten, dass zwei Oszillatoren, die miteinander interagieren, diesen bimodalen Aktivitätsrhythmus generieren. Hauptvoraussetzung für die Funktionalität des Modells ist, dass die Periodik der beiden Oszillatoren unterschiedlich auf Licht reagiert. Es kann nur dann eine Anpassung des Organismus an saisonale Schwankungen der Tageslänge erreicht werden, wenn der Morgenszillator eine verkürzte Periode nach langer Tagesbeleuchtung (z.B. im Sommer) aufweist, und *vice versa* der Abendszillator eine verlängerte Periode generiert (Pittendrigh und Daan, 1976). Dies hat einen früheren Beginn der Morgenaktivität und eine verspätet einsetzende Abendaktivität zur Folge, ermöglicht also eine Verbreiterung der Phasenlage der Aktivitätspeaks. Somit erfolgt die ideale Aktivitätsanpassung tagaktiver Tiere an heiße Sommertage, da Zeit für eine ausgiebige „Siesta“ zur Vermeidung der Mittagshitze ist (Majercak et al., 1999). Bestätigt wurde dieses vielzitierte Modell vor allem durch jüngst publizierte Arbeiten, die die Validität dieses Ansatzes durch Studien der Inneren Uhr von *D. melanogaster* überprüften. Die Zellen des Morgen- und Abendszillators wurden vermutlich identifiziert. Der Morgenpeak wird von den vier PDF-positiven s-LN<sub>v</sub>-Zellen kontrolliert, die aufgrund dessen als M-Zellen (M, von engl. „morning“) bezeichnet werden. Hingegen wird die Generierung des Abendpeaks der fünften s-LN<sub>v</sub> und einigen LN<sub>d</sub>-Zellen zugesprochen, weshalb diese Zellen als E-Zellen (E, von engl. „Evening“) bezeichnet werden (Grima et al., 2004; Stoleru et al., 2004; Rieger et al., 2006).

## 4. Überblick über die Teilprojekte der Dissertation

Meine Dissertation umfasst zwei Projekte. Eine spezielle Einführung für die beiden Teilgebiete wird vor den jeweiligen Kapiteln zu finden sein.

In dieser Arbeit sollte mitunter überprüft werden, wie die Taufliegen schwaches Licht wahrnehmen, und welche Photorezeptoren dafür verantwortlich sein könnten. So wurde im ersten Projekt, dem sog. Mondlichtprojekt, durch Simulation von natürlicher Beleuchtung in der Nacht (Beleuchtungsstärke von etwa Viertelmond) möglicherweise auftretende Verhaltensanpassungen der Taufliegen an diese Beleuchtungsbedingungen analysiert. Darüberhinaus sollte ein potentieller

Effekt des Mondlichts auf die Phasenlage der Inneren Uhr überprüft werden, um damit auch Aussagen über die Photosensorik des circadianen Systems gewinnen zu können. Im zweiten Teil der Dissertation sollte die Expressions- und Funktionsanalyse eines bisher nicht charakterisierten Proteins der Taufliege Aufschluss über eine potentielle Rolle des Proteins als Photorezeptorpigment, speziell der Schwachlicht- und Rotlichtrezeption geben. Das Protein, das aufgrund hoher Sequenzhomologie mit den bekannten Rhodopsinen 1-6 der Taufliege Rhodopsin 7 (RH7) genannt wurde, gilt als möglicher Kandidat für einen noch unbekannten Photorezeptor in *Drosophila melanogaster*.

## **II. Teil 1: „Mondlichtprojekt“**

## 1. Einleitung

### 1.1. Der Einfluss von Tages- bzw. Mondlicht auf die Aktivitätsrhythmik von *D. melanogaster*

Während „stabiler Lichtphasen“ speziell in der Morgen- und Abenddämmerung synchronisieren Lebewesen täglich ihre Innere Uhr mit den externen Zeitgebern (vor allem Licht) der Umwelt (Bünning, 1969). Bünning beschäftigte sich im Speziellen damit, wie eine stabile Synchronisation der Inneren Uhr eines Organismus an den Tag-Nacht-Wechsel vollzogen wird, in Unabhängigkeit vom Wetter, das große Helligkeitsunterschiede verursachen kann, was wiederum einer stabilen Synchronisation entgegenwirken könnte. Er fand durch systematisch Messung der Lichtintensität in der Morgen- und Abenddämmerung heraus, dass die Helligkeitsunterschiede am geringsten sind am frühen Morgen und späten Abend, bei unter 10Lux Intensität (Bünning, 1969). Die Organismen „stellen“ also ihre Innere Uhr am frühen Morgen und späten Abend, zu einer Zeit wenn diese zuverlässigen, stabilen Lichtintensitäten auftreten. Eine Voraussetzung hierfür ist, dass sehr schwaches Licht wahrgenommen werden kann. Es stellt sich daher die Frage, wie der Organismus die in der Natur vorkommende, manchmal sehr helle Beleuchtung des Mondlichts interpretiert, und diese von der folgenden Morgendämmerung unterscheidet.

Mondlicht ist vom Mond reflektiertes Sonnenlicht, wobei nur etwa ein Millionstel der Lichtintensität des Sonnenlichts auf die Erde auftrifft, natürlich je nach Mondphase stark variierend. Vollmond kann durchaus über 0,2Lux Intensität erreichen (Messungen von Kempinger, 2006). Die Emissionsspektren von Sonnen- und Mondlicht weisen nur geringe Unterschiede der spektralen Zusammensetzung auf (Heldmaier und Neuweiler, 2003). Es sollte aber erwähnt werden, dass kurzwellige, energiereiche Strahlung wie z.B. UV-Strahlung nicht bis zur Erde reflektiert wird.

Im Gegensatz zu Bünning nehmen viele Autoren an, dass Mondlicht ein nur sehr schwacher Zeitgeber ist, der die Phasenlage der Innere Uhr kaum beeinflusst. Es gibt aber auch Studien, die zeigen, dass Tiere in Mondnächten ihr Verhaltensmuster und Aktivitätsniveau an die nächtliche Lichtquelle anpassen. Diese Arbeiten wurden überwiegend an nachtaktiven Säugern durchgeführt (Erkert, 1974). Bisher jedoch wurden keine Experimente durchgeführt, inwieweit nächtliches Mondlicht die Aktivitätsrhythmik bzw. Phasenlage der Inneren Uhr auch tagaktiver Arten, wie z.B. der Taufliege *Drosophila melanogaster* beeinflussen könnte.

## 1.2. Ziele des Mondlichtprojekts

Ein Ziel der Arbeit ist es, erstmalig detailliert das Oszillieren der Uhrproteine PER und TIM in den einzelnen circadianen Uhrneuronen unter LD- und Licht-Mondlicht-Zyklen (LM) der Taufliege zu vergleichen, um zu überprüfen, inwieweit sich die Periodik in den M- und E-Zellen verändert. Dies ist durch immunhistochemisches Markieren der Uhrproteine PER und TIM möglich. Eine zusätzliche immunohistochemische Markierung des Peptids PDF ermöglichte die Unterscheidung der Zellgruppen bzw. Zellen im Gehirn der Taufliege. Gleichzeitig sollte getestet werden, inwieweit sich nächtliches Mondlicht auf das Aktivitätsmuster auswirkt. Es besteht eine Korrelation zwischen Menge an Uhrprotein und Aktivitätsniveau: zum Zeitpunkt der höchsten Aktivität der Fliege ist die Uhrproteinmenge am geringsten, und umgekehrt ist die Aktivität am geringsten, wenn die höchste Uhrproteinmenge nachweisbar ist (Yoshii et al., 2004).

Durch Wahl einer sehr niedrigen Mondlichtintensität von 0,03Lux Intensität wird eine nächtliche Beleuchtung, wie sie etwa bei Viertelmond auftritt, simuliert. Die Analyse der Experimente soll einen Eindruck über die Lichtsensitivität des circadianen Systems vermitteln, und im Speziellen über die Prozessierung dieser Lichtinformation im endogenen Oszillator. Die Gültigkeit des Pittendrigh-Daan-Modells für diese experimentelle Annäherung an natürlichere Lichtbedingungen soll diskutiert werden. Des Weiteren sollen Experimente mit Photorezeptormutanten die Frage beantworten, welche Photorezeptoren von *D. melanogaster* für die gefundene Lichtempfindlichkeit verantwortlich sind.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Nährmedium und Aufzuchtbedingungen

Die Fliegen wurden bei 20°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 65% in Gläsern auf einem Nahrungsbrei, bestehend aus 0,8% Agar, 2,2% Rübensirup, 8,0% Malzextrakt, 1,8% Bierhefe, 1,0% Sojamehl, 8,0% Maismehl/-gries und 0,3% Nipagin (Antimykotikum), gehalten. In den Zuchträumen herrschte ein künstlicher Tag/Nacht-Rhythmus von 12/12h LD. Die Betäubung der Fliegen, z.B. zum Einsetzen in die Aktivitätsanlage erfolgte mit CO<sub>2</sub>.

### 2.2. Fliegenstämme

Es sollte vor allem untersucht werden, ob sich durch nächtliches Mondlicht das Verhalten rotäugiger Wildtyp *Canton S- Fliegen* (Konopka et al., 1989) im Vergleich zur Lokomotorrhythmik unter LD-Zyklen unterscheidet. *Canton S* dient auch als Kontroll- und Vergleichsstamm für alle anderen getesteten Photorezeptormutanten. Die *cryptochrome<sup>baby</sup>* (*cry<sup>b</sup>*) Mutante, die eine Punktmutation in der Flavin-bindenden Region des Proteins trägt und somit kein funktionelles Cryptochrom besitzt (Stanewsky et al., 1998), wurde getestet, ebenso die sog. *eyes absent* (*cli<sup>eya</sup>*) Mutante, die keine Komplexaugen mehr besitzt, sich jedoch durch funktionierendes Cryptochrom, sowie intakte Ocellen und Anwesenheit des Hofbauer-Buchner-Äugleins auszeichnet (Bonini et al., 1993). Freundlicherweise wurden die *cli<sup>eya</sup>* Fliegen von Lena Kempinger und die *cry<sup>b</sup>*-Fliegen von Dominik Bichler jeweils im Rahmen von Diplomarbeiten bei 0,5Lux Mondlicht getestet.

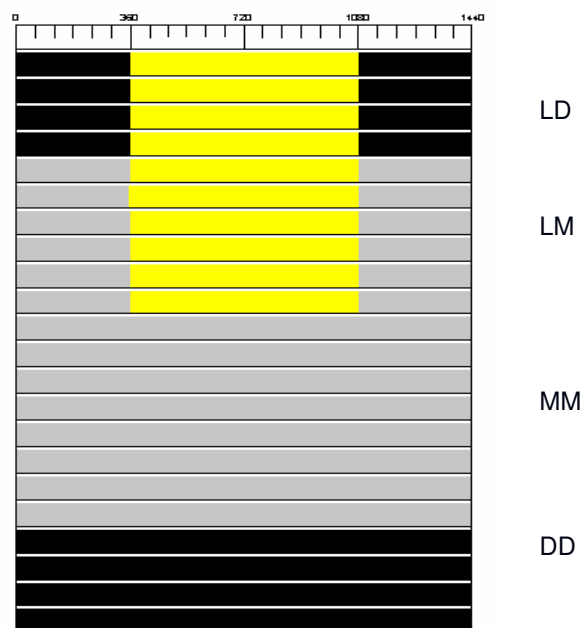
### 2.3. Verhaltenstests

Zur Messung der Lokomotoraktivität wurden 1-3 Tage alte Fliegen verwendet, die im Experiment einzeln in Photometer-Küvetten mit ständig verfügbarer Zucker- und Wasserversorgung gehalten wurden. Die Küvetten wurden am vorderen Ende mit einer durchsichtigen Plexiglasabdeckung verschlossen. Durch das schmalere Ende jeder Küvette wurde senkrecht ein Infrarotstrahl geleitet. Unterbrach die Fliege die Lichtschranke, wurde dies von der gegenüberliegenden Photozelle als „Aktivität“ registriert. Innerhalb eines 4 Minuten-Intervalls wurden über eine Interfacekarte, die mit den Phototransistoren der Lichtschranke verbunden ist, von einer peripheren Prozessoreinheit (PPU) die Unterbrechungen registriert, es wurde also aufgezeichnet, ob die Fliege innerhalb der

letzten 4 Minuten aktiv war oder nicht. Die PPU, die über 2 Multiplexer mit 8 Interfacekarten von 2 Aufzeichnungsbereichen verbunden ist, speicherte die Aktivitätsaufzeichnungen. Ein Prozessor, gesteuert von einer externen Funkuhr, die mit dem PC verbunden ist, las die Rohdaten von der PPU ab und speicherte diese.

### 2.3.1. Wahl des Lichtprogramms

In den ersten 5 Tagen wurden die Fliegen einem Licht-Dunkel-Zyklus (LD) ausgesetzt, der dem LD während der Aufzucht (LD 12:12) entsprach. Die darauf folgenden 7 Tage wurde ein Licht-Mondlichtzyklus (LM) simuliert, ebenfalls mit einem Lichtwechsel nach jeweils 12 Stunden (LM 12:12). Um die endogene Rhythmik ohne den Einfluss äußerer Zeitgeber zu untersuchen, wurden die Fliegen in einem nächsten Schritt für 10 Tage im Dauermondlicht (MM) und darauf folgend die restlichen Tage im Dauerdunkel (DD), bis die Freilaufperiode gut zu analysieren war, getestet (siehe Abb. 6).



**Abb. 6: Schematisierte Graphik des Lichtprogramms**

Um das Aktivitätsverhalten der Fliegen mit dem Lichtprogramm, dem äußeren Zeitgeber, zeitlich in Beziehung zu setzen, wurden in der folgenden Arbeit die Zeitangaben in Zeitgeberzeit (ZT) oder in Minutenwerten gemacht. ZT 0 bzw. ZT 24 ist durch Licht-an, ZT 12 durch Licht-aus definiert (Moore-Ede et al., 1982). Die zur Simulation des Tageslichtes verwendeten Xenophot Halogenlampen (12V, 120W) von Osram (Berlin, Germany) strahlen im Vergleich zu natürlichem

Sonnenlicht kein UV-Licht (200-380nm) aus. Durch Reflexion an einem Haushaltsspiegel wurde das Licht der Halogenlampe zur gleichmäßigen Ausleuchtung der Küvettenreihen umgelenkt. Das Mondlicht wurde simuliert, indem die Beleuchtungsstärke von 4 weissen Leuchtdioden (LED's, Lumitronix LED Technik, GmbH, Jungingen, Germany) durch mehrere Graufilter mit einer Transmission von  $3 \times 10^{-1}$  verringert wurde. Um von den Leuchtdioden diffuses Licht zu erhalten, wurde eine Ozalid Zeichenfolie vorgelegt, so dass die Aufzeichnungsbereiche gleichmäßig ausgeleuchtet wurden. Durch die Graufilter (ROSCO Laboratories, London, U.K.) wurde nur die Intensität verringert, das Spektrum jedoch nicht verändert. Mit Hilfe des angeschlossenen Potentiometers wurde die Lichtstärke auf etwa 500 Lux bzw.  $250\text{-}300 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  eingestellt. Die Lichtstärke des simulierten Mondlichtes entsprach den Beleuchtungsstärken während zunehmendem oder abnehmendem Viertelmond.

### 2.3.2. Analyse der Lokomotorrhythmik

Die Auswertung der Lokomotoraktivität wurde von Lena Kempinger im Rahmen einer Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe Förster vorgenommen (Kempinger, Diplomarbeit, 2006).

Die Rohdaten wurden mit dem Programm Hellroda (Joachim Schuster, Tübingen, 1993) in für den Atari darstellbare Dateien umgewandelt und in Oxalako (Joachim Schuster, Tübingen, 1996) eingelesen. Dieses EDV-Programm erstellte für jeden Kanal ein Aktogramm. Das Programm erlaubte darüber hinaus eine Berechnung der Durchschnittstage über beliebige Zeitintervalle für jede einzelne Fliege bzw. für alle Fliegen eines Stammes. So wurde das mittlere Aktivitätsprofil für jeden Genotyp während LD und LM ermittelt. Die in Textdateien umgewandelten Daten wurden im Anschluss in Microsoft Excel, 2003 eingelesen und mit Hilfe von Techplot (Ralf Dietrich, Braunschweig) graphisch dargestellt. Diese Software ermöglichte eine Glättung der Kurven (Akima). In Oxalako wurden außerdem die Aktivitätsmengen für jeden Tag einer Fliege berechnet. Im Anschluss wurde für jeden Genotyp die durchschnittliche Aktivitätsmenge im LD, LM, MM und DD in Excel ermittelt. Für die weitere Datenbearbeitung wurden die Rohdaten zuerst unter dem Betriebssystem Linux mit Pyth2elT (Stefan Neumann, Tübingen 2000) in Textfiles zusammengefügt und in eine lineare Auftragung der Aktivität gegen die Zeit übertragen. Um die Bestimmung der Phasenlage des Aktivitätsmaximums zu erleichtern, wurden die Daten mit Hilfe eines unter Linux laufenden Filterprogrammes (entwickelt von Winfried Hellrung) geglättet (Lacroix A., 1980; detaillierte Beschreibung in Helfrich-Förster, 2000). Periodenlängen und Acrophase wurden mit dem Auswertungsprogramm El Temps (A. Diez-Noguera, Barcelona, Spanien, 1999) bestimmt. Dazu wurden die ungefilterten und gefilterten Daten als Textdateien in das Programm eingeladen. Die Bestimmung der Aktivitätsmaxima (Acrophasen) erfolgte an den



gefilterten Daten, während die Periodenlängenberechnung an den ungefilterten Originaldaten durchgeführt wurde.

## 2.4. Immunhistochemie

### 2.4.1. Antikörperfärbung und Präabsorption des polyclonalen PER-Serums

Zur Analyse der Uhrproteinkonzentrationen (PER und TIM) in den circadianen Hauptschrittmacherzellen wurden die *Canton S*-Fliegen 4 Tage unter LD oder LM Bedingungen synchronisiert. Um die Oszillation der Proteinkonzentrationen während des kompletten Tagesverlaufs zu messen, wurden die Fliegen zu den Zeitpunkten ZT 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 und 23 abgesammelt und durch Versenken in 4% Paraformaldehydlösung auf Phosphatpufferbasis (mit 0,5% Triton X-100) getötet und fixiert. Nach 2 Stunden Fixierung wurden die Fliegen mit Phosphatpuffer (PP) gewaschen und per Hand jeweils mindestens 10 Gehirne pro Zeitpunkt als Totalpräparate aus den Köpfen entnommen. Über Nacht wurde mit 5% NGS (Ziegenserum, normal goat serum) geblockt und dann die Immunfärbung mit den in Tabelle 1 genannten primären Antikörpern zur Detektion von PER, TIM und PDH durchgeführt.

**Tab. 1: Auflistung der verwendeten primären Antikörper.**

Antikörper	Wirtsorganismus	Verdünnung	Referenz/ Quelle
$\alpha$ -PER	Kaninchen	1:1000	Stanewsky et al., 1997
$\alpha$ -TIM	Ratte	1:1000	Kaneko et al., 1997
$\alpha$ -PDH (nb33)	Maus	1:1000	Waltenspiel B., 2005

Zur Präabsorption des PER-Antikörpers wurden maximal 12 Stunden alte *per<sup>01</sup>*-Embryonen abgesammelt und für 3 bis 4 Minuten mit NaHClO dechorionisiert und mehrmals in Wasser mit 0,5 % Triton X-100 gewaschen. Nach 20 min. Fixierung in paraformaldehydgesättigtem n-Heptan wurde durch mehrmaliges Ausschütteln mit Methanol die Vitellinmembran gelöst und entfernt. 100µl der im Methanol abgesunkenen Embryonen wurden für je 2 Minuten in einer 4°C kalten Methanolreihe (90%, 70%, 50%, 30% Methanol in PBS (10mM PO<sub>4</sub>, 137 mM NaCl, pH 7,4)) inkubiert und dann 3x in PBS (mit 0,5 % Triton X-100) gewaschen. 500µl Antikörperlösung (polyclonaler PER-Antikörper, 5% NGS, 0,5% Triton X-100 und 0,02% NH<sub>3</sub> in PBS) mit den Embryonen konnten somit über Nacht auf 4°C präabsorbiert werden (Stanewsky et al., 1997a).

Nach 2 Tagen auf 4°C wurde der primäre Antikörper abgenommen und die Gehirne 5x mit PPT (Phosphatpuffer mit 0,5% Triton X-100) gewaschen. Daraufhin wurden diese mit den in Tabelle 2 beschriebenen, sekundären, fluoreszenten Antikörpern für 24h inkubiert.

**Tab. 2: Auflistung der verwendeten fluoreszenten, sekundären Antikörper.**

Antikörper	Wirt; Zielorganismus	Verdünnung	Quelle
Alexa Fluor 488	Ziege; $\alpha$ -Kaninchen	1.200	Invitrogen, CA
Alexa Fluor 568	Ziege; $\alpha$ -Ratte	1:200	Invitrogen, CA
Alexa Fluor 674	Ziege; $\alpha$ -Maus	1:200	Invitrogen, CA

Nach fünfmaligem Waschen mit PPT (je 15 Minuten) wurden die Hirne auf einem Glasobjektträger in Vectashield® Medium eingebettet, mit einem Deckglas abgedeckt und mit *rubber cement* (FixoGum, Marabu, Germany) luftdicht verschlossen.

#### 2.4.2. Quantifizierung der Antikörperfärbung, konfokale Lasermikroskopie

Das Scannen der Präparate erfolgte durch ein konfokales Lasermikroskop (LSM 510 META, Carl Zeiss MicroImaging, Jena, Germany), das die fluoreszent markierten Antikörper (Tabelle 2) durch Laseranregung wie folgt visualisiert: PER-Färbung: grün, TIM-Färbung: rot und PDF-Färbung: blau. Die einzelnen Zellgruppen der lateralen Neurone oder Einzelzellen (5. s-LN<sub>v</sub>) wurden getrennt mit einer Auflösung von 1024x1024 Pixel gescannt. Die so erhaltenen Bilder wurden in das Programm NIH ImageJ (Wayne Rasband, frei verfügbare Software) importiert und in 8-bit RGB-Bilder konvertiert (siehe Rieger et al., 2006). Die Färbeintensität jeder identifizierten Zelle bzw. Zellgruppe wurde bestimmt sowie der Färbehintergrund des Gewebes in unmittelbarer Nähe dieser. Anschließend wurde die Signalstärke gegenüber dem Hintergrund bestimmt mit der Kalkulation: Intensität (Zelle) = (Wert (Zelle) minus Hintergrund)/Hintergrund. Daraus wurden der Mittelwert, die Standardabweichung (SD) und der Standardfehler (SEM) berechnet.

## 2.5. Westernblot

Die Anfertigung und Auswertung der Westernblots wurde von Dr. Corinna Wülbeck vorgenommen. Die Fliegen wurden nach 4-tägiger Synchronisation zu LD oder LM Zyklen alle 2-3 Stunden abgesammelt. Die Extraktion der Proteine aus den Köpfen und die weiteren

Arbeitsschritte wurden größtenteils wie in Wülbeck et al., (2005) beschrieben, vollzogen. Die Antikörper wurden mit folgender Konzentration verwendet:  $\alpha$ -PER: 1:10000 wie beschrieben in Stanewsky et al., (1997), sowie  $\alpha$ -TIM: 1:5000, siehe Myers et al., (1996). Der sekundäre Antikörper war fluoreszent gekoppelt (goat anti rabbit, IRdye800 (Rockland Gibertsville, PA) mit einer Konzentration von 1:5000 in 5% Trockenmilchpulver in TBS mit 0,1% Tween 20. Die Signaldetektion wurde mit dem Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences) vollzogen, die Berechnung der Färbeintensität erfolgte mit dem Programm NIH ImageJ (Wayne Rasband, frei verfügbare Software).

### 2.6. Statistik

Die Intensität der immunhistochemischen Färbungen der Zellen/Zellcluster wurde auf signifikante Unterschiede zwischen LD- und LM-Bedingungen separat für jede Zelle-bzw. Zellgruppe durch Verwendung der „one-way“ ANOVA getestet. Daraufhin folgte ein *post hoc*-Test zum paarweisen Vergleich der Färbeintensitäten (Systat 10; SPSS, Chicago, IL). Als signifikant wurden Werte angesehen, wenn  $p < 0,05$  war (ANOVA).

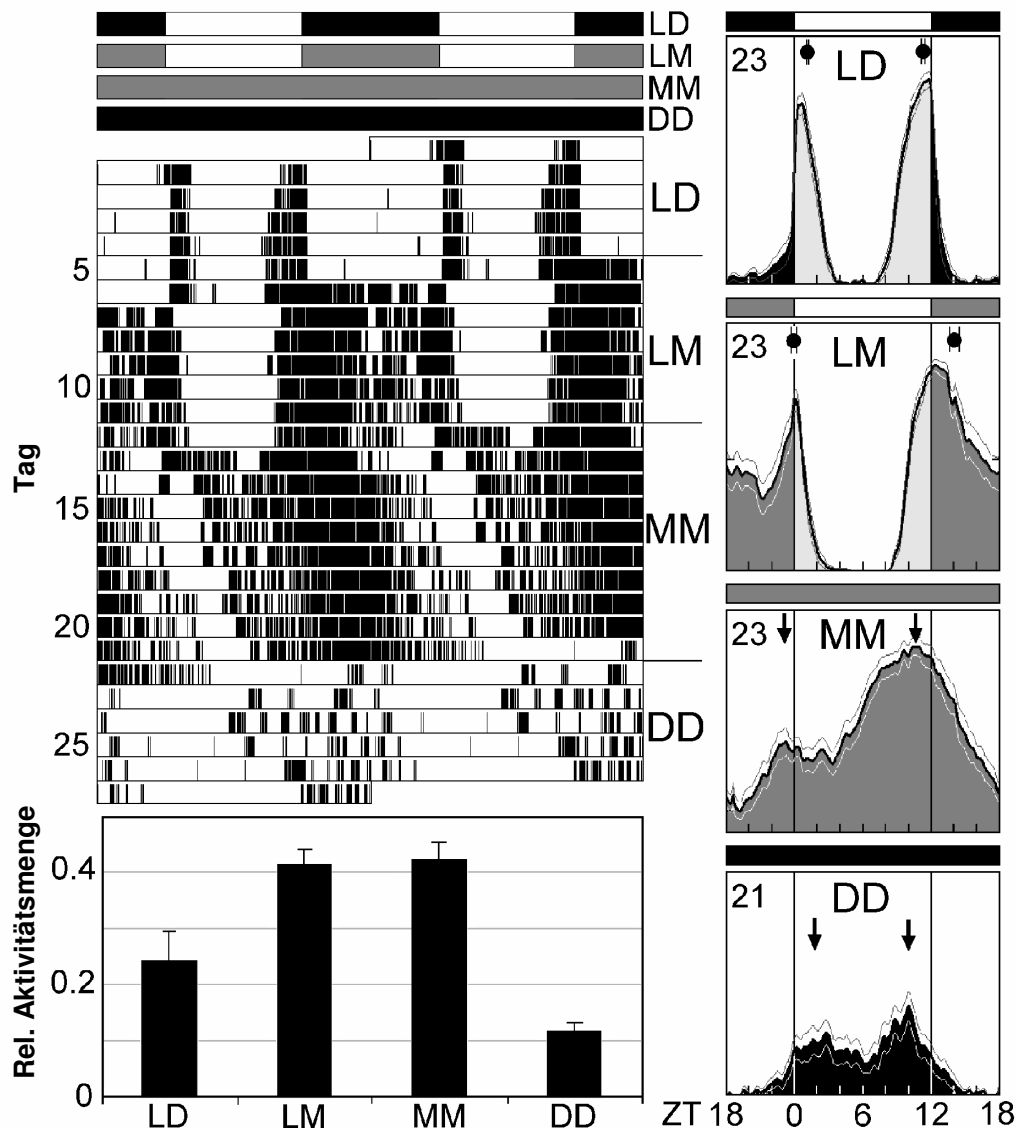
### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Der Einfluss des Mondlichts auf das Verhalten von *D. melanogaster*

##### 3.1.1. Analyse des Laufverhaltens in LD-, LM-, MM- und DD-Zyklen

Die Wildtyp *Canton S*-Fliegen wurden zunächst 5 Tage unter einem **LD**-Zyklus (LD 12:12) gehalten. Hierbei zeigte sich das typische bimodale Aktivitätsmuster mit Morgen- und einem prominenteren Abendpeak (Helfrich-Förster et al., 2000) (Abb. 7). Der Morgenpeak begann kurz vor Licht-an, gipfelte jedoch erst unter dem sog. „Licht-an-Effekt“– einer direkten Reaktion auf das Einschalten des Lichtes (ZT 0)– in einem Maximum (Rieger et al., 2003). Dieser Effekt ist ein positiver Maskierungseffekt (Aktivitätsanstieg) und tritt als direkte Verhaltensreaktion auf Licht-an unabhängig von der Inneren Uhr auf (Mrosovsky et al., 1996 und 1999). Basierend auf dem gleichen Phänomen ist zum Zeitpunkt des „Licht-aus“ (ZT 12) eine starke Unterdrückung der Aktivität erkennbar (negativer Maskierungseffekt) (Abb. 7). Nach Wechsel des Lichtprogramms auf **LM**-Bedingungen (LM 12:12), in denen die Fliegen für weitere 7 Tage gehalten wurden, veränderte sich das Verhaltensmuster deutlich. Die Maskierungseffekte verschwanden vollkommen, d.h. die Unterdrückung der Aktivität in der Dunkelheit wurde durch das Mondlicht in der Nacht aufgehoben und das Anschalten des Lichtes am Morgen sorgte nicht mehr für einen Aktivitätsanstieg. Darüberhinaus verschoben die Fliegen ihre Hauptaktivität morgens wie abends in die Nacht. Der Morgenpeak begann durchschnittlich um etwa eine Stunde früher ( $\pm 0,2h$ ), der Abendpeak erschien bis zu 3 Stunden ( $\pm 0,2h$ ) später und lag deutlich in der „hellen“ Nacht. So konnte festgestellt werden, dass Mondlicht von 0,03 Lux Intensität eine deutliche Verbreiterung der Phasenbeziehung der Aktivitätspeaks verursacht. Die für LD-Bedingungen typische Abnahme der Aktivität um Mitternacht konnte nicht mehr so deutlich beobachtet werden, im Gegenteil dazu führte die nächtliche Illumination zum Teil so weit, dass 16% der Fliegen in der Mondlichtphase durchgehend aktiv waren, Morgen- und Abendaktivität also überlappten (Kempinger, Diplomarbeit, 2006). Als Konsequenz dessen erschien die „Mittagsruhe“ (um ZT 6) deutlich verbreitert. Generell wirkte das Mondlicht „aktivierend“: Ein signifikanter Anstieg des durchschnittlichen Aktivitätsspiegels im Vergleich LD zu LM konnte gezeigt werden (Abb. 7). Ein Wechsel des Lichtprogramms in Dauermondlicht **MM** führte zu Freilauf unter Beibehaltung der verbreiterten Phasenlage zwischen Morgen- und Abendpeak (unter LM) mit einer Periodenlänge von durchschnittlich 24,8h. Abend- und Morgenaktivitätsmaximum näherten sich im darauf folgenden Dauerdunkel **DD** wieder aneinander an. Da die Berechnung der Periodenlänge des Freilaufs im DD etwa 24,7h ergab, kann von einer Veränderung der

Geschwindigkeit der Inneren Uhr nicht gesprochen werden. Die Fliegen wiesen jedoch ein signifikant höheres Aktivitätsniveau im MM wie im DD auf (Abb. 7).

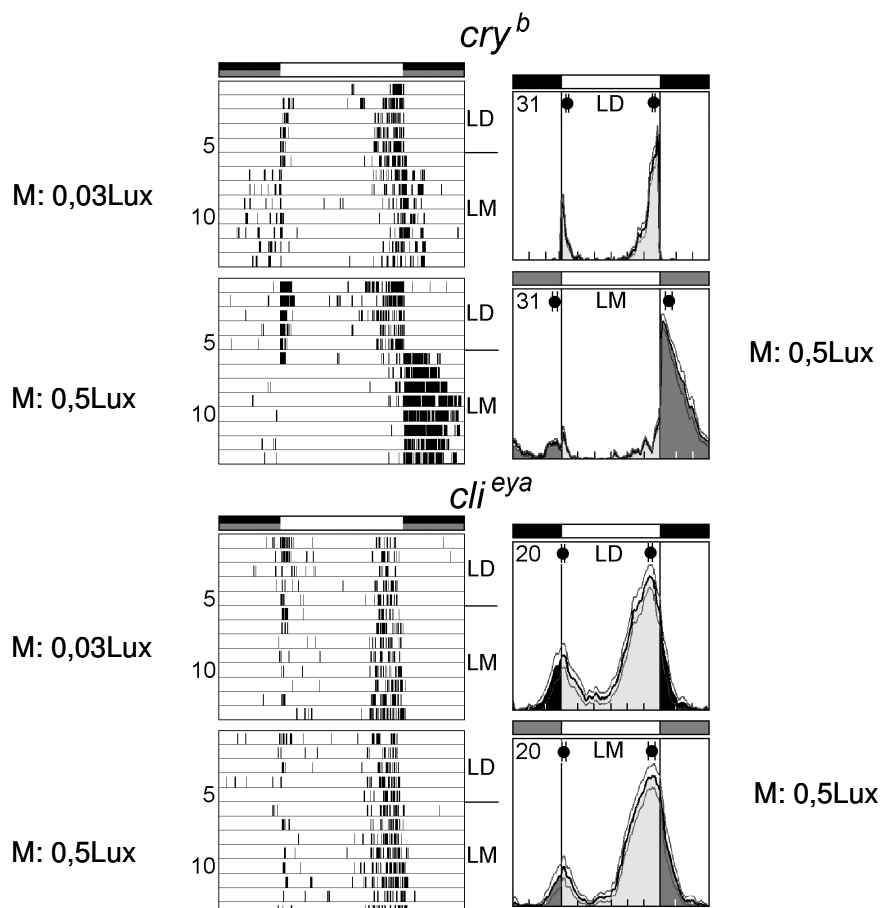


**Abb. 7: Verhaltensmuster von Wildtyp-(*CantonS*)-Fliegen unter LD-, LM-, MM- und DD-Zyklen.**

Links oben: Aktivitätsprofil einer Einzelfliege im Doppelplot dargestellt. Die Verschiebung der Aktivität in die Nacht im LM im Vergleich zu LD unter Verbreiterung der Phasenlage des Morgen- und Abendpeaks ist erkennbar. Rechts: Durchschnittstage aller Fliegen in den verschiedenen Beleuchtungszyklen mit Angabe der Anzahl der gestesteten Fliegen und angezeigter Lage der Aktivitätspeaks mit Punkten und Pfeilen (im Freilauf). Die Verschiebung der Aktivität in die Nacht unter LM und MM einhergehend mit einer Verbreiterung der Phasenlage der Aktivitätspeaks ist erkennbar. Eine deutliche Abnahme der Aktivität in DD ist erkennbar. Links unten: Relative Aktivitätsmengen unter den gewählten Beleuchtungsprogrammen. Die signifikante Erhöhung der Aktivitätsmenge im Vergleich LD zu LM und ebenso Verringerung zwischen MM und DD ist ersichtlich. Die Fehlerbalken stellen die Standardfehler dar.

### 3.2. Rhodopsine sind die „Mondlichtphotorezeptoren“

Für die Verhaltensversuche wurden ausser dem Wildtypstamm *Canton S* auch Photorezeptor-Mutanten getestet um eine Charakterisierung des Beitrags der Photorezeptoren zum Verhalten unter Mondlichtbedingungen zu gewährleisten: Fliegen ohne funktionellem Cryptochrom (*cry<sup>b</sup>*) (Stanewsky et al., 1998) und Fliegen ohne Komplexaugen (*cli<sup>eya</sup>*) (Bonini et al., 1993). Alle getesteten Genotypen konnten in einem LM-Zyklus mit 0,03Lux Mondlicht synchronisiert werden. Die durchschnittliche Periodenlänge betrug 24h ( $\pm 0,03$ h). Es waren jedoch gravierende Unterschiede im Verhaltensmuster zwischen LD- und LM-Zyklen deutlich. So konnte in den *cli<sup>eya</sup>*-Fliegen im Vergleich zum Wildtyp *Canton S* keine Verbreiterung der Phasenbeziehung zwischen Morgen- und Abendpeak nachgewiesen werden, auch wenn die Mondlichtstärke auf 0,5 Lux erhöht wurde. Darüber hinaus ist auch keine spürbare Erhöhung der Aktivitätsmenge ersichtlich (Abb. 8). *Cry<sup>b</sup>*-Fliegen jedoch zeigten mit dem Wildtyp *Canton S* vergleichbare Ergebnisse, so konnte ein deutlich verfrühter Morgenpeak, eine Verspätung des Abendpeaks sowie eine Erhöhung der Aktivitätsmenge im Mondlicht manifestiert werden (Abb. 8). Somit kann der „Mondlichteffekt“ auf das Vorhandensein von Komplexaugen und somit den Rhodopsinen zurückgeführt werden.



**Abb. 8: Aktogramme und Durchschnittstage der Photorezeptormutanten *cry<sup>b</sup>* und *cli<sup>eya</sup>*.**

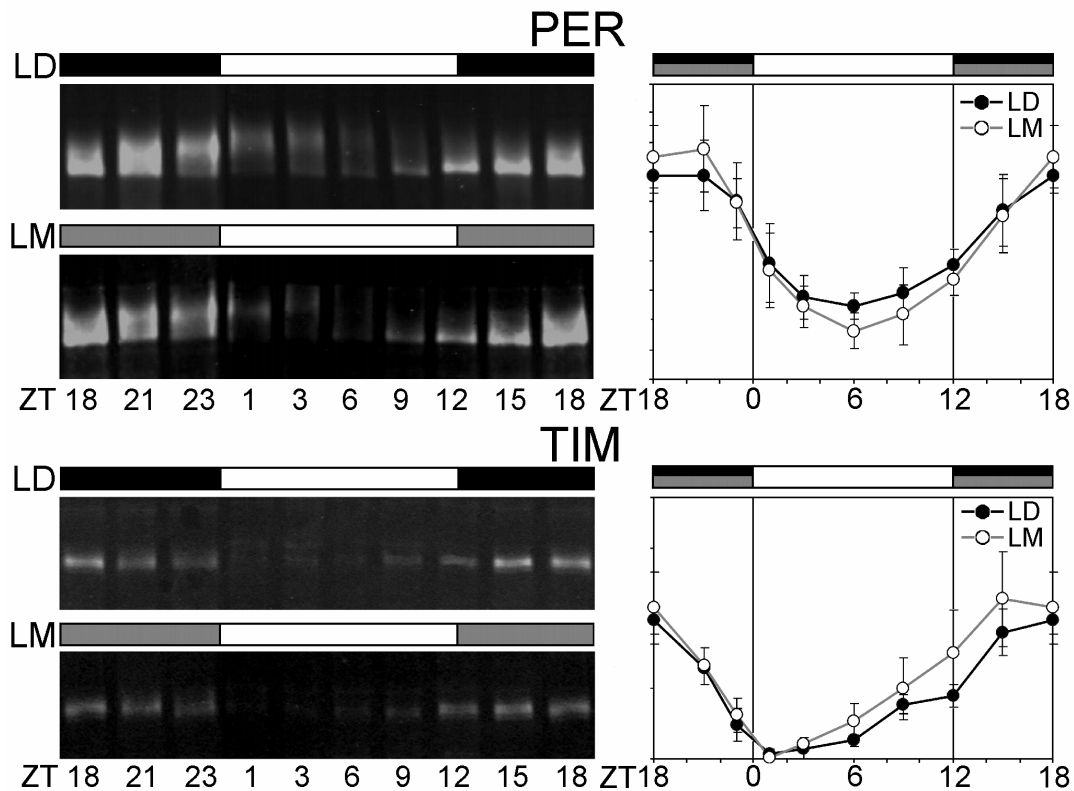
M: Mondlichtintensität. Links: Die Aufzeichnungen von jeweils 2 Einzelfliegen pro Genotyp zeigen, dass alle Fliegen zu einem 24h LM-Zyklus (LM 12:12) mit 0,03Lux (*cry<sup>b</sup>*) bzw 0,5Lux (*cli<sup>eya</sup>*) Mondlicht synchronisiert werden können. *cli<sup>eya</sup>*-Fliegen zeigten im Vergleich zu *cry<sup>b</sup>* und Wildtypfliegen (siehe Abb. 7) keine Reaktion auf nächtliches Mondlicht.

**3.3. Der Einfluss des Mondlichts auf die Innere Uhr**

Weiterführend wurde der Frage nachgegangen, ob sich die im Vergleich zu Dunkelheit durch niedrige nächtliche Beleuchtung verursachten gravierenden Verhaltensmodifikationen auch auf molekularer Ebene im circadianen System der Fliege nachweisen lassen.

**3.3.1. Überprüfung der „peripheren Oszillatoren“ im Komplexauge**

Wie bereits erwähnt leisten die Photorezeptoren einen gravierenden Beitrag zur Generierung des „Mondlichteffekts“ auf Basis der Lokomotoraktivität. Es wurden daher auch die Auswirkungen des Mondlichts auf die zahlreichen peripheren Uhren im Komplexauge überprüft, die in den Photorezeptoren der Augen und Gliazellen der optischen Loben die Uhrproteine PER und TIM exprimieren (Chen et al., 1992; Ewer et al., 1992; Helfrich-Förster, 1995; Zerr et al., 1990). Durch Westernblot-Analyse von Fliegenköpfen, die zu bestimmten festen Zeiten abgesammelt wurden, konnten die PER- und TIM Konzentration während LD- und LM-Zyklen analysiert und verglichen werden. Es stellte sich heraus, dass sich der Rhythmus der Uhrproteinexpression durch nächtliches Mondlicht nicht veränderte, und somit die peripheren Uhren in den Komplexaugen nicht beeinflusst wurden (Abb. 9).



**Abb. 9: Unveränderter Rhythmus der PER- und TIM-Proteinexpression im Vergleich von LD- und LM-Bedingungen.**

Links: Westernblots, Anti-PER und Anti-TIM gefärbt. Rechts: Durchschnittliche Antikörperfärbintensität (Anti-PER und Anti-TIM) von je 3 repräsentativen Westernblots unter LD- und LM-Zyklen. Keine signifikanten Unterschiede waren erkennbar. Die Fehlerbalken stellen Standardfehler dar.

### 3.3.2. Veränderungen in den lateralen und dorsalen Uhrneuronen im Zentralgehirn

Um den Einfluss des Mondlichts auf die Innere Uhr von *D. melanogaster* interpretieren zu können, wurden die Oszillationen der Uhrproteine PER und TIM in den Hauptschrittmacherzellen des Zentralgehirns durch Immunmarkierung unter LD- und LM-Bedingungen verglichen. Die Proteinspiegel konnten durch Kalkulation der Färbintensität der einzelnen Zellen bzw. Zellcluster ermittelt werden.

#### 3.3.2.1. Reduktion der PER- und TIM-Proteinmenge

Als ein gravierender Unterschied zu den unter LD durch Antikörperfärbintensität kalkulierten Proteinspiegeln stellte sich eine erhebliche Reduktion des Proteinmengen von PER und TIM unter LM Bedingungen heraus. Es wurde– und das betraf alle Zellgruppen gleichermaßen– eine



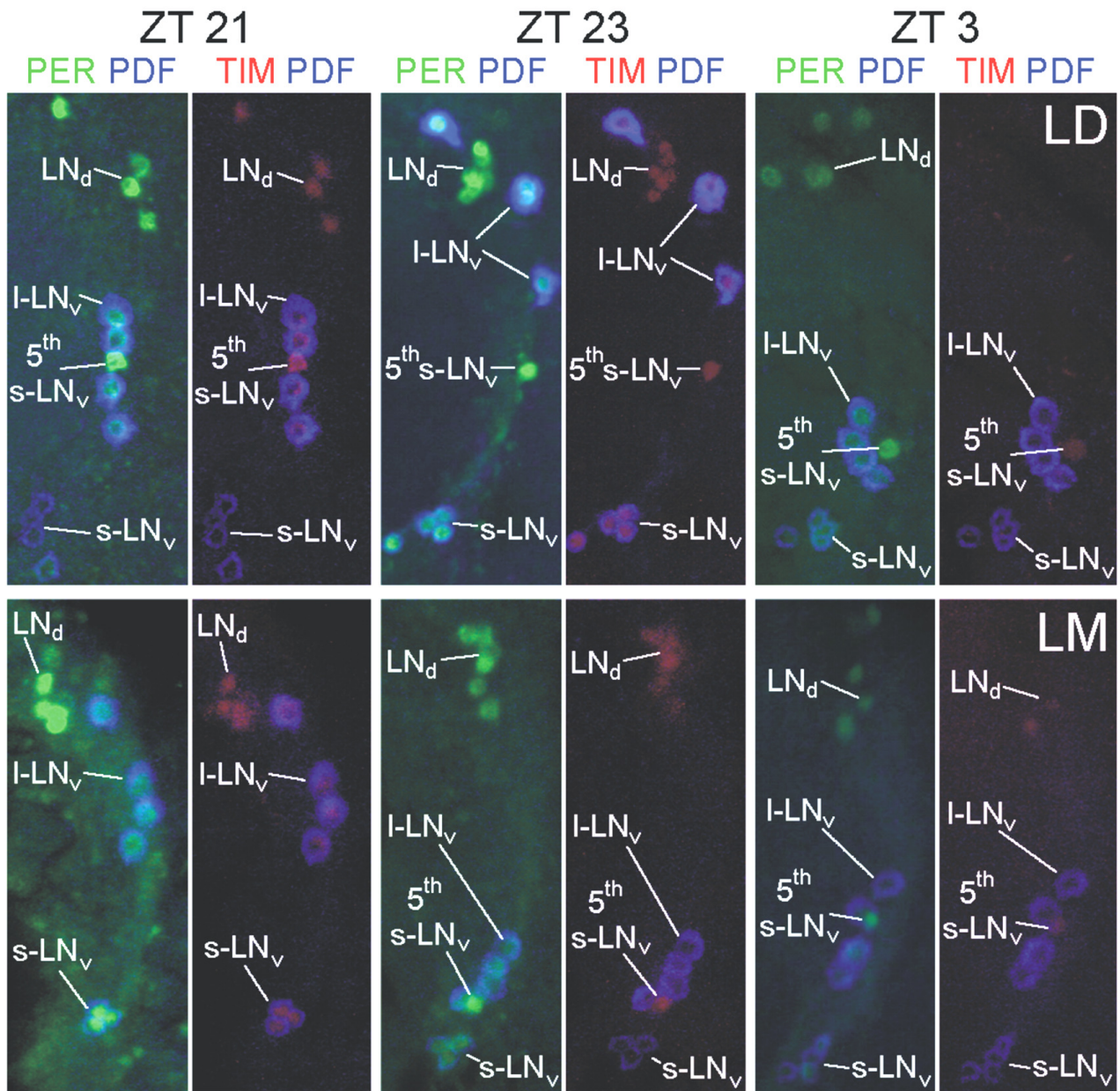
Verringerung um etwa 30% des Proteinspiegels im Vergleich zu LD beobachtet (Abb. 9 und 10). Bekannt ist, dass unter LD-Zyklen eine negative Korrelation zwischen dem Aktivitätslevel und der Uhrproteinmenge besteht, d.h. zu Zeiten, wenn die Fliege nicht aktiv ist (Nacht) ist der Proteinspiegel hoch und zu Zeiten hoher Aktivität (z.B. am Abend) sind die geringsten Proteinmengen detektierbar. Übereinstimmend mit dieser Beobachtung konnte festgestellt werden, dass die Fliegen– wie oben beschrieben– verursacht durch das Mondlicht fast die ganze Nacht aktiv waren (siehe Abb. 8) und die Proteinmengen unter LM-Bedingungen ebenso drastisch reduziert waren (Abb. 9).

### 3.3.2.2. Der Effekt von Mondlicht auf die Phasenlage des Morgen- und Abendoszillators

Wie eingehend erwähnt besitzt die Taufliege die aus drei Zellclustern bestehenden dorsalen Uhrneurone: DN<sub>1</sub>, DN<sub>2</sub> und DN<sub>3</sub> sowie drei Gruppen lateraler Neurone (LN), die s-LN<sub>v</sub>, die l-LN<sub>v</sub> und die LN<sub>d</sub>'s. Die s-LN<sub>v</sub> können weitergehend in vier PDF-positive s-LN<sub>v</sub> und eine sog. fünfte s-LN<sub>v</sub> untergliedert werden, die kein PDF enthält (Kaneko et al., 1997; Rieger et al., 2006). Die LN reichen aus, um einen stabilen bimodalen Rhythmus in adulten Fliegen bei einem LD-Zyklus zu generieren (Chang et al., 2006). Mehrere Studien weisen darauf hin, dass der Morgenpeak von den vier PDF-positiven s-LN<sub>v</sub> Zellen kontrolliert wird und diese aufgrund dessen als M-Zellen bezeichnet werden. Hingegen wird die Generierung des Abendpeaks (Eveningpeak) der fünften s-LN<sub>v</sub> und einigen LN<sub>d</sub> Zellen zugesprochen, weshalb diese Zellen als E-Zellen bezeichnet werden (Grima et al., 2004; Stoleru et al., 2004; Rieger et al., 2006). Durch immunhistochemisches Markieren der Uhrproteine PER, TIM und auch eines Precursors von PDF konnten die Zellgruppen bzw. Zellen voneinander unterschieden werden. Dadurch konnte die PDF-negative fünfte s-LN<sub>v</sub>, die meist in direkter Nähe der PDF- positiven l-LN<sub>v</sub> liegt identifiziert werden. Ein Ziel der Arbeit war das Oszillieren der Uhrproteine PER und TIM in den einzelnen circadianen Uhrneuronen unter LD- und LM Bedingungen zu vergleichen. So wurde überprüft, ob sich nächtliches Mondlicht nicht nur auf die im vorigen Kapitel beschriebenen Verhaltensänderungen auswirkt, sondern inwieweit sich auch die Periodik in den M- und E-Zellen verändert.

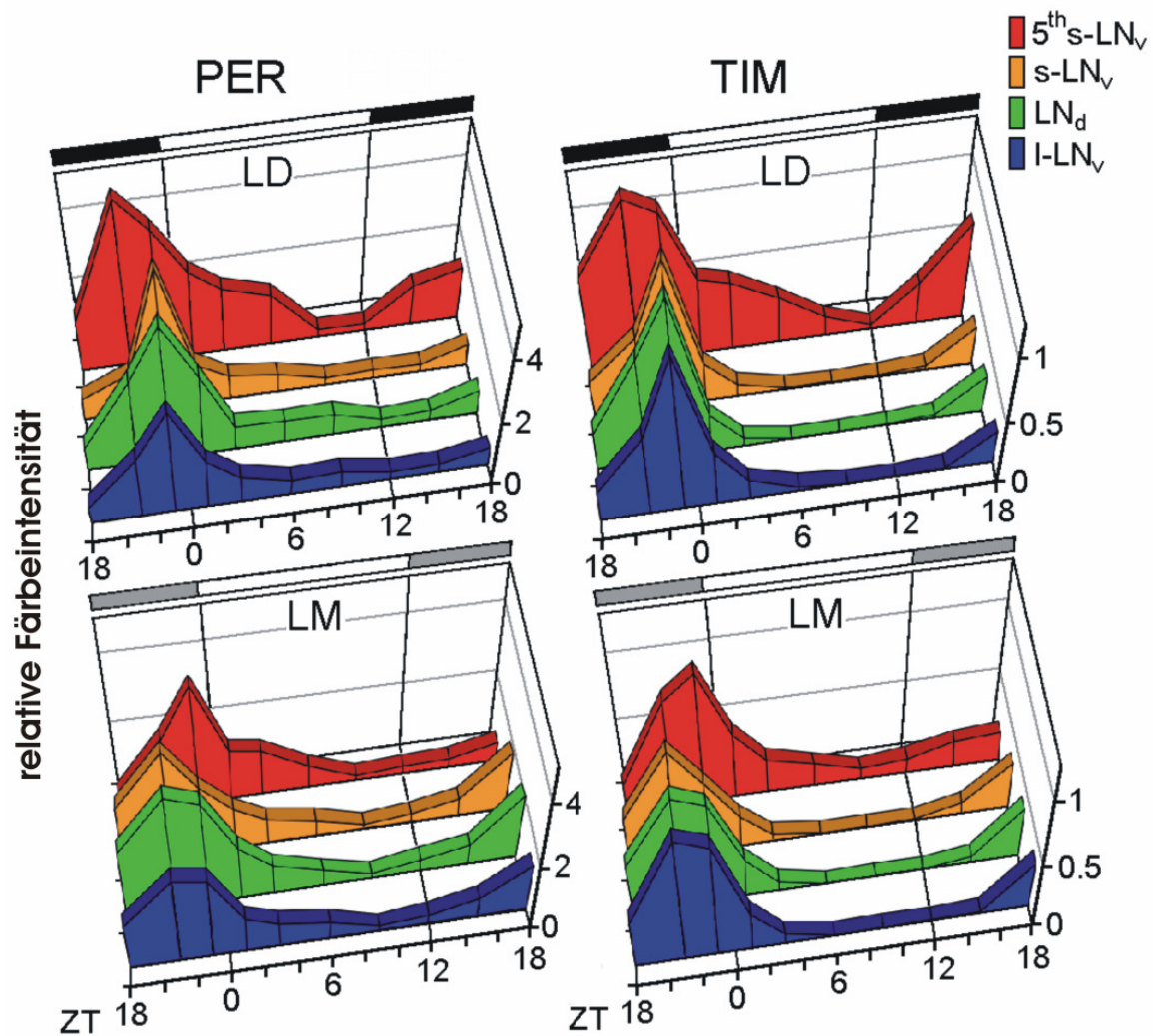
Es stellte sich heraus, dass unter LD-Bedingungen die s-LN<sub>v</sub>, die LN<sub>d</sub> und die l-LN<sub>v</sub> die maximale Proteinmenge zum Zeitpunkt ZT 23, also 1 Stunde vor Licht-an akkumulierten. Dieses Ergebnis wurde auch in früheren Studien von O. Shafer (2002) veröffentlicht. Die früher in Larven beschriebene fünfte s-LN<sub>v</sub> (Kaneko et al., 1997) wurde jedoch in dieser Studie nicht getrennt berücksichtigt. Die Bestimmung des Färbemaximums in dieser Zelle ergab, dass schon 3 Stunden vor Licht-an, also zu ZT 21, ein breiter Peak der Uhrproteine erreicht wurde, der im Vergleich zu

den anderen getesteten Neuronen, in denen die Proteine rascher abgebaut wurden, in einer flachen Schulter bis zu Licht-an abklang. Signifikante Phasenverschiebungen der PER- und TIM-Proteinexpressionspeaks in allen Zellgruppen bzw. Zellen wurden erkennbar nachdem die Fliegen nächtlichem Mondlicht von 0,03Lux ausgesetzt wurden. Beide Proteine wurden jeweils gleichzeitig maximal in den Zellen akkumuliert, so konnte in den s-LN<sub>v</sub> Zellen– also den M-Zellen– eine Verfrühung der Phasenlage (phase advance) um 2 Stunden auf ZT 21 beobachtet werden. Im Kontrast dazu wurde in der fünften s-LN<sub>v</sub> (einem Teil der E-Zellen) ein um 2 Stunden verspäteter Proteinpeak (phase delay) bestätigt (Abb. 10 und 11). Die Verschiebung der Proteinpeaks korreliert mit den Aktivitätsmustern (Abb. 12): Mondlicht induziert eine Verfrühung des Morgenpeaks und eine Verspätung des Abendpeaks (Abb. 10 und 11). Der zweite Teil der E-Zellen, die LN<sub>d</sub>'s jedoch verhielten sich wie die M-Zellen und verschoben den Proteinpeak unter LM-Bedingungen um 2 Stunden nach vorne (Abb. 12). Vergleichbar mit den LN<sub>d</sub>'s verschoben die l-LN<sub>v</sub> auch um 2 Stunden nach vorne. Bei beiden Zellclustern ist aber ein sehr breiter Proteinpeak erkennbar, der auf eine vermutete Heterogenität der Zellen zurückzuführen sein könnte (Rieger et al., 2006).



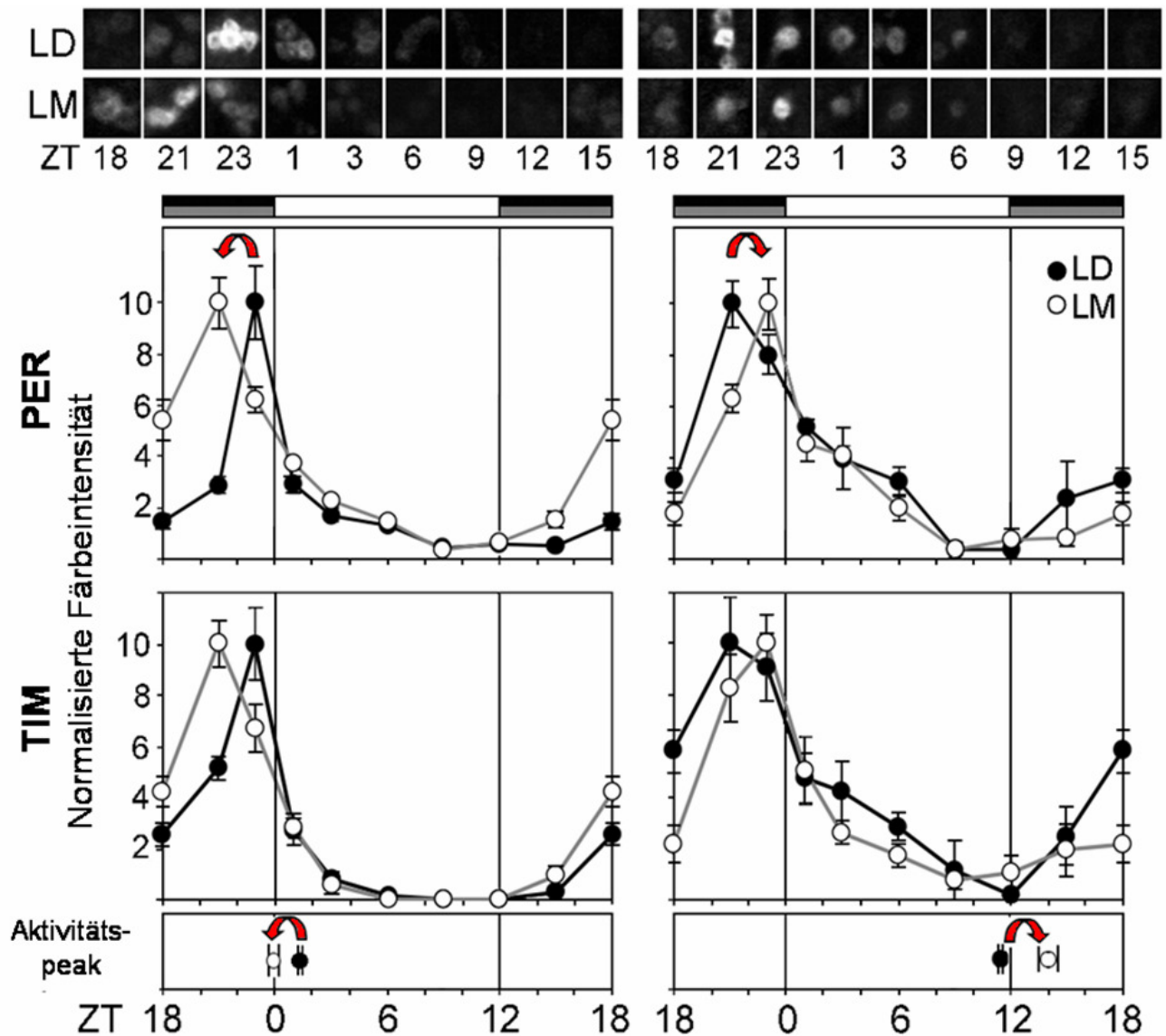
**Abb. 10: Nächtliches Mondlicht induziert Phasenverschiebungen der Uhrprotein-Expression in den Hauptschrittmacherzellen von *D. melanogaster*.**

Die Graphik zeigt Ausschnitte confokaler Aufnahmen des Zentralgehirns im Bereich der lateralen Neurone zu den Zeiten ZT 21, 23 und ZT 3 während LD- und LM-Bedingungen. PER wurde grün, TIM rot und PDF blau angefärbt. Die PDF-Färbung war zur Identifizierung der PDF-negativen fünften s-LN<sub>v</sub> nötig, die anatomisch meist in Höhe der PDF-positiven I-LN<sub>v</sub> lokalisiert wurde.



**Abb. 11: Quantifizierung der Färbintensitäten der PER- und TIM-Antikörperfärbung im Zeitverlauf eines Tages im Vergleich von LD- und LM-Bedingungen.**

Maximale Proteinexpression in der fünften s-LN<sub>v</sub> (roter Graph) war um ZT 21 in LD, unter LM jedoch erst um ZT 23. Die s-LN<sub>v</sub> (orange), LN<sub>d</sub>'s (grün) und die l-LN<sub>v</sub> (blau) wiesen die maximalen Proteinkonzentration in LD-Zyklen um ZT 23 auf, unter LM-Bedingungen verfrühte sich der sich jedoch stark verbreiternde Peak und war um ZT 21 nachweisbar. Bei den LN<sub>d</sub>'s und den l-LN<sub>v</sub> verbreiterte sich der Peak zusätzlich stark.



**Abb. 12: Die durch Mondlicht in der Nacht bedingte Verschiebung der Proteinpeaks korreliert mit den Veränderungen der Aktivitätsmuster.**

Durch den Übergang von LD auf LM wird eine Verfrühung des Morgenpeaks, der mit einem phase advance in den M-Zellen einhergeht, induziert. Ebenso ist eine Verspätung des Abendpeaks beobachtbar, entsprechend ist ein phase delay in zumindest einem Teil der E-Zellen (der fünften s-LN<sub>v</sub>) ersichtlich.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass durch nur geringfügige Beleuchtung in der Nacht anstelle von Dunkelheit ein sog. Mondlichteffekt ausgelöst wurde, der wahrscheinlich auf das Vorhandensein von Rhodopsinen in den Komplexaugen zurückzuführen ist. Es wurden drastische Verhaltensänderungen hervorgerufen, und darüber hinaus wurde die Phasenlage der Inneren Uhr von *D. melanogaster* deutlich beeinflusst. In Analogie zu einer Vergrößerung der Phasenbeziehung zwischen Morgen- und Abendaktivitätspeak bis zur nahezu vollständigen

Nachtaktivität konnte eine dazu einhergehende Expansion der Phasenbeziehung zwischen den Proteinmaxima von PER und TIM in den M- und E-Zellen des circadianen Systems nachvollzogen werden. Erhebliche Veränderung der Geschwindigkeit der Inneren Uhr durch nächtliches Mondlicht konnte nicht festgestellt werden.



## 4. Diskussion

### 4.1. Durch nächtliches Mondlicht provozierte Nachtaktivität von Taufliegen ist nicht nur ein Ausdruck von Lichtpräferenz

Das typische, bimodale Aktivitätsprofil von Wildtypfliegen unter einem artifiziellen, rektangulären LD-Zyklus mit Morgen- und Abendaktivitätsmaxima sowie einer ausgedehnten Mittagsruhe ist bekannt und wurde schon beschrieben, z.B. durch Helfrich-Förster (2000). Doch in der Natur ist es in der Nacht nur allzu selten „stockdunkel“. Die in der Natur vorherrschenden Lichtbedingungen, die etwa bei Viertelmond auftreten, wurden simuliert und mit den LD-Daten verglichen.

Charakteristisch für ein wildtypisches LD-Aktivitätsprofil ist der rapide Aktivitätsanstieg bei Tages- oder Lichtbeginn der „Licht-an“-Effekt und ein reflexartiger Abbruch der Aktivität bei Beginn der Dunkelheit, der „Licht-aus“-Effekt. Es handelt sich um Maskierungseffekte oder „masking“, eine direkte Auswirkung von Lichteffekten auf das Verhaltensmuster, hierfür ist die endogene Uhr nicht der Auslöser (Mrosovsky et al., 1996 und 1999). Morgenaktivität vor und Abendaktivität nach der 12h Lichtphase wird durch die Dunkelheit unterdrückt. Unter LM Zyklen konnte gezeigt werden, dass Fliegen deutlich auf nächtliches Mondlicht reagieren: Sie werden nachtaktiv! (Abb. 7)

Genauer betrachtet werden durch nächtliches Mondlicht die im LD erkennbaren negativen Maskierungseffekte (Aktivitätsunterdrückung durch Dunkelheit) aufgehoben, die Aktivitätspeaks am Abend und Morgen erscheinen symmetrischer und abgerundeter, und zusätzlich mit einem enormen Aktivitätsanstieg ist eine hoch signifikante Verbreiterung der Phasenlage nachweisbar. Der Morgenpeak erscheint früher, der Abendpeak später, bedingt dadurch wird die Mittagsruhe länger und um Mitternacht werden die Fliegen aktiver (Abb. 7). Eine interessante Parallele zu Hamstern ist erkennbar. Bei 10Lux Mondlicht in der Nacht verfrüht sich der Morgenpeak erheblich, es konnte auch eine Verbreiterung der Aktivitätsphase an sich beobachtet werden. Ist diese Flucht in die Nachtaktivität nur eine Anpassung an niedrigere, von *Drosophila* bevorzugte Lichtintensitäten? Diplomarbeiten von Fraunholz (2006) und Popp (2006) weisen auf Bevorzugung niedriger Lichtintensitäten hin (0,065 bis 10Lux), und maximale Aktivitätsniveaus wurden bei Lichtintensitäten bei nur etwa 10Lux ermittelt (Rieger et al., 2007). In freier Wildbahn ergaben Messungen, dass Fliegen vor allem in Regionen mit einer Beleuchtung zwischen 5- und 10Lux zu finden sind (R. Costa, persönliche Mitteilung).

Ist nun diese Nachtaktivität ein Ausdruck schlichter Lichtpräferenz? Nein: es konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass die endogene Rhythmik ebenso verändert wird. So ist ein „phase

advance“ der Proteinpeaks der PER- und TIM-Expression der M-Zellen nachweisbar. Identisch mit der im Verhalten gezeigten Verspätung des Abendpeaks ist ein „phase delay“ des Uhrproteinmaximums in zumindest einem Teil der E-Zellen (der fünften s-LN<sub>v</sub>) erkennbar. Die daraus resultierende Frage, ob nun aufgrund von Veränderungen in der Inneren Uhr diese Nachtaktivität ausgelöst wird, wie dies Mrosovsky (1996) beschreibt, oder ob es sich vor allem um Maskierungseffekte aufgrund von Lichtpräferenzen handelt, kann nicht eindeutig beantwortet werden. Auch bei Versuchen mit Uhrmutanten konnte gezeigt werden, dass Masking sehr wohl eine wichtige Rolle spielt: Tageslicht unterdrückt Aktivität, Mondlicht wirkt mobilisierend (Kempinger, Diplomarbeit, 2006). Ähnlich wie bei Tauflieden sind Verhaltensmodulationen durch Maskierungseffekte auch bei Weißkopfmaki (*Eulemur fulvus albifrons*) erkennbar: Mondlichtgabe lässt auch diese Tiere nachtaktiv werden und Aktivität in Dunkelheit und zu grellem Licht wird vermieden (Erkert und Cramer, 2006). Sehr ähnliche Effekte wie bei *Drosophila* konnten auch bei graufüßigen Nachtaffen (*Aotus lemurinus griseimembra*) beobachtet werden (Erkert und Gröber, 1986).

Der Mondlichteffekt lässt sich wohl auf eine Wechselwirkung beider Phänomene zurückführen, da auch eine Anpassung der endogenen Periode aufgrund von Veränderungen im Verhalten bereits beschrieben wurde (Mrosovsky, 1996).

#### **4.2. Die Bedeutung der Lichtsensitivität der Photorezeptoren und des circadianen Systems**

Während stabiler Lichtphasen speziell in der Morgen- und Abenddämmerung synchronisieren Lebewesen täglich ihre Innere Uhr mit den externen Zeitgebern (vor allem Licht) der Umwelt (Bünning, 1969). Eine Voraussetzung hierfür ist, dass sehr schwaches Licht wahrgenommen werden kann. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass das circadiane System von *Drosophila* hoch lichtsensitiv ist und bereits niedriges Dauermondlicht in der Nacht Verhaltensmodifikationen sowie gravierende Änderungen des Oszillationsrhythmus der Inneren Uhr auslöst. Schon bei minimalen Mondlichtintensitäten um 0,004 Lux zeigen die Fliegen Reaktionen in der Lokomotoraktivität (D. Bichler, Diplomarbeit 2007). Es stellt sich die Frage, welche Photorezeptoren hierfür verantwortlich sind.

Die peripheren Uhren in den optischen Loben reagieren nicht auf Mondlicht, obwohl deren Photorezeptorzellen mondlichtsensitiv sind. Es konnte im Vergleich LD zu LM keine Veränderung des Proteinexpressionsrhythmus beobachtet werden (Abb. 9). Dies erscheint auch verständlich und sinnvoll, da für die Bildaufnahme im Tageslicht eine reflexartige präzise Adaptation an die sich schnell ändernden Lichtverhältnisse gewährleistet sein sollte, um jederzeit eine optimierte Sehleistung zu erzielen. Circadiane Photorezeptoren sollten sich jedoch zumindest



nicht in Bereichen niedriger Lichtintensität anpassen, um schon geringfügige Helligkeitsunterschiede– wie sie in der Abend- und Morgendämmerung vorkommen– detektieren und sie von diffusem Dauermondlicht unterscheiden zu können. Übereinstimmend mit dieser Hypothese ist keine Veränderung der Phasenlage der Proteinexpression der peripheren Uhren, jedoch in den M- und E-Zellen der Uhrneuronen festgestellt worden (Abb. 11 und 12). Die hohe Bedeutung der Komplexaugen– und damit den Rhodopsinen– zur Anpassung an variable Tageslängen wurde in einer Studie von D. Rieger beschrieben (2003). Auch die Ergebnisse meiner Arbeit zeigen auf, dass die Komplexaugen die Photorezeptoren für die beobachteten Phänomene sind. Interessanterweise sind die Rhodopsine der Insekten nahe verwandt mit dem circadianen Photorezeptor Melanopsin der Säugetiere, dem eine wichtige Rolle der Lichtrezeption auch niedriger Intensitäten zugesprochen wird (Peirson und Foster, 2006; Panda et al., 2005). Der circadiane Blaulichtrezeptor Cryptochrom ist ein Kandidat, der dem Organismus ermöglichen könnte, nächtliches Mondlicht von Dämmerungslicht unterscheiden zu können, da sich nur in der Dämmerung der Anteil von Blaulicht entscheidend verändert (Heldmaier und Neuweiler, 2003). Es sollte jedoch erwähnt werden, dass *cry<sup>b</sup>*-Fliegen, denen Cryptochrom fehlt, wie die Wildtyp-Fliegen ihre Aktivität durch nächtliches Mondlicht verschoben, diese Fliegen die Reaktion jedoch erst unter einer höheren Mondlichtintensität von 0,5Lux zeigten (siehe Abb. 8). Cryptochrom hat also eine Funktion in der Mondlichtsensorik. Der Mondlichteffekt auf das Verhalten der Tiere erscheint jedoch unabhängig von Cryptochrom. So konnte in den *cli<sup>eya</sup>*-Fliegen (Fliegen ohne Komplexaugen jedoch mit Cryptochrom) im Vergleich zum Wildtyp *Canton S* keine Verbreiterung der Phasenbeziehung zwischen Morgen- und Abendpeak nachgewiesen werden, auch wenn die Mondlichtstärke auf 0,5 Lux erhöht wurde (siehe Abb. 8). Weitere Experimente sind nötig, um die Rolle von Cryptochrom aufzuklären.

Doch wie wird nächtliches Mondlicht in LM-Zyklen wahrgenommen und prozessiert?

Hier zeigt sich wie sensibel die circadianen Photorezeptoren auf nur äußerst geringfügige Intensitätsunterschiede im Dämmerlicht reagieren können. Dies wird offensichtlich, da Mondlicht von 0,03 Lux Intensität zwar eine Verbreiterung der Phasenlage der Aktivitätspeaks verursacht, jedoch im Vergleich zu einer Studie in MM von 0.5Lux Intensität (etwa Vollmond) keine Entkopplung der Morgen- und Abendszillatoren (sog. interne Desynchronisation) beobachtet werden kann (Rieger et al., 2006), geschweige denn Arrhythmizität als Folge einer Interpretation von LM als LL auftritt (Aschoff, 1979; Konopka et al., 1989; Rieger et al., 2006). Diese Arrhythmizität wird durch das Versiegen der Oszillationen der Uhrproteine in den Uhrneuronen, das durch den lichtbedingten Abbau von TIM (via Cryptochrom) prozessiert wird, hervorgerufen (Emery et al., 2000; Rosato et al., 2001). Es scheint plausibel, dass in den sensitiven Uhrneuronen die Mondlichtintensität nicht ausreicht um die Uhrfunktion komplett zu zerstören, jedoch ausreicht, um etwa 30% der Proteine kontinuierlich abzubauen (Abb. 9). Wirkt sich diese

Proteinreduktion auf die Geschwindigkeit des endogenen Oszillators aus? Ein Vergleich der Periodenlänge von MM und DD klärt diese Frage auf: eine Verlängerung der Freilaufperiode wie unter LL-Bedingungen von J. Aschoff (1958) prognostiziert ist nicht nachvollziehbar (siehe auch Abb. 7).

Es ist nicht bekannt, ob auch andere Lebewesen eine so hochempfindliche Fähigkeit der Lichtwahrnehmung wie die Taufliege besitzen, doch neuerdings werden vermehrt Effekte, hervorgerufen von, z.B. nächtlichem Mondlicht an Säugern (Gorman et al., 2005 und 2006; Evans et al., 2007) charakterisiert. So konnte in diesen Studien eine präzisere Anpassung an verschiedene Photoperioden durch nächtliche Mondlichtgabe erreicht werden. Auch diese Erkenntnisse können als Hinweis dafür gelten, dass Mondlicht einen erheblichen Effekt auch auf die innere Uhr auslöst. Dies könnte als Hinweis dafür gelten, dass auch heute noch primitive, marine Tiere ihren Reproduktionszyklus an lunaren Zyklen ausrichten (Danilenko et al., 2000).

Zurück zu dieser Arbeit: was bewirkt nun dieser Mondlichteffekt auf molekularer Ebene in den Uhrneuronen? Dies soll nun detailliert im nächsten Abschnitt diskutiert werden.

### **4.3. Die Relevanz einer flexiblen Inneren Uhr bei sich verändernden, natürlichen Lichtverhältnissen: Unterstützung für das „2-Oszillatoren-Modell“ von Pittendrigh und Daan**

Die Ergebnisse dieser Arbeit erinnern an das vielzitierte sog. 2-Oszillatoren-Modell von Pittendrigh und Daan (1976), das beschreibt, dass zwei vermutlich gekoppelte circadiane Oszillatoren einen robusten, sich an natürlich wechselnde Lichtverhältnisse anpassenden Tagesrhythmus generieren können. Die Aufklärung der neuronalen Grundlagen des bimodalen Aktivitätsprofils von *Drosophila* bestätigte die Validität und bekräftigte die Anwendbarkeit des ursprünglich für Nager entwickelten Modells auch für die Taufliegen (Stoleru et al., 2004; Grima et al., 2004; Rieger et al., 2003 und 2006; Helfrich-Förster, 2006; Miyasako et al., 2007).

Erstmalig wird in dieser Arbeit ein vertiefender Einblick in die Veränderungen des molekularen Zustands der endogenen Oszillatoren gewährt, der durch sehr niedriges Mondlicht– vergleichbar der Lichtstärke bei Viertelmond– hervorgerufen wird. Speziell die Phasenlage der Uhrproteine in den M- und E-Zellen ist interessant, um deren Beitrag für die Veränderungen im Aktivitätsprofil zu diskutieren.

Betrachtet man die PER- und TIM-Proteinexpressionsmuster in den für die Generierung des Morgenpeak verantwortlichen s-LN<sub>v</sub>– also den M-Zellen– so kann im Vergleich der LM zu den LD eine Verfrühung der Phasenlage (phase advance) um 2 Stunden von ZT 23 auf ZT 21 beobachtet werden (Abb. 10 und 11). Die Verschiebung der Proteinpeaks korreliert exakt mit der Verfrühung des Morgenpeaks im Aktivitätsmuster (Abb. 12). Wenn man in Analogie zur

Verfrühung des Aktivitätspeaks und des Uhrproteinpeaks in den M-Zellen eine Verspätung des Proteinpeaks (im Einklang mit der Verspätung des Abendaktivitätspeaks) in den E-Zellen erwartet, so kann diese Vermutung bestätigt werden. Bemerkenswerterweise trifft dies aber nur für einen Teil der E-Zellen, der fünften s-LN<sub>v</sub> zu (Abb. 10 und 11). Der Mondlichteffekt führt zu einem phase delay von 2 Stunden: Von ZT 21 (LD) auf ZT 23 (LM). Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten jedoch nicht darauf hin, dass die LN<sub>d</sub> eine Rolle als E-Zellen spielen, wie von Grima (2004) und Stoleru (2004) beschrieben. Die Zellen verhalten sich ähnlich den M-Zellen, der Mondlichteffekt äussert sich in einem phase advance (Abb.10 und 11). Bei genauerer Betrachtung fällt auf, dass der breite Proteinexpressionspeak sehr flache Schultern zeigt (Abb. 11). Wie bei den LN<sub>d</sub> ist eine Verbreiterung der Proteinpeaks auch bei den l-LN<sub>v</sub> durch den Mondlichteffekt hervorgerufen worden (Abb.10 und 11). Eine Erklärung hierfür könnte eine schon früher von Rieger (2006) vermutete Heterogenität der Zellen sein. Auch Yoshii et al., (in press) bestätigt Unterschiede innerhalb der Zellen dieses Zellkomplexes: Nur drei der sechs LN<sub>d</sub> haben Cryptochrom. Es wurde in Erwägung gezogen, dass die einzelnen Zellen des Clusters zu unterschiedlichen Zeiten ihre Proteinexpressionsmaxima aufweisen, und somit der Gipfel der gemittelten Färbeintensität abgerundete erscheint. Rieger (2006) nimmt auch an, dass nur eine LN<sub>d</sub> eine E-Zelle ist, da nach fünf Tagen in LL-Bedingungen nur eine „extra LN<sub>d</sub>“ in Phase mit der fünften s-LN<sub>v</sub> war und so die langperiodische Komponente kontrollierte. Es ist gut möglich, dass auch diese extra LN<sub>d</sub> einen phase delay aufzeigt, ohne spezifischen Marker war es aber nicht möglich diese Zelle von den anderen LN<sub>d</sub> zu unterscheiden. Es wird also deutlich, dass die Proteinexpression der M-Zellen genauso wie das Maximum der Morgenaktivität früher erscheint, und sich vice versa die Abendaktivität wie die Proteinexpressionsmaxima der E-Zellen verspätet. Zusammenfassend bekräftigen diese Ergebnisse die Vermutung, dass das 2-Oszillatoren-Modell von Pittendrigh und Daan (1976) optimal geeignet ist, um die Flexibilität der Inneren Uhr auf jahreszeitliche Veränderungen der Tageslänge auch bei der Taufliege zu erklären. Es konnte gezeigt werden, dass niedrige Mondlichtintensitäten unterschiedlich auf die Phasenlage der M- und E-Oszillatoren wirken, und sich die Phasenbeziehung zwischen Morgen- und Abendaktivitätspeak verbreitert, wie auch von Evans (2007) diskutiert wurde. Weitergehend konnte wie von Rieger (2006) vermutet bestätigt werden, dass die s-LN<sub>v</sub> die M-Zellen und zumindest die fünfte s-LN<sub>v</sub> einen Teil der E-Zellen darstellen.

## 5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde schwaches Mondlicht (0,03Lux) zur Simulation natürlicher Lichtbedingungen in der Nacht gewählt, um einerseits etwaige Verhaltensanpassungen der Taufliegen zu studieren und um andererseits vertiefende Einblicke in die Photosensorik der Inneren Uhr und deren Organisation zu erlangen. Es stellte sich heraus, dass die Wildtyp *Canton S*-Fliegen ihre Hauptaktivität in die Nacht verschoben und dadurch die Phasenlage zwischen Morgen- und Abendpeak deutlich breiter wurde. Die Fliegen wurden also nachaktiv, der negative Maskingeffekt, der im Vergleich in LD auftritt, verschwindet. Dies kann auch als klare Lichtpräferenz für niedrige Lichtintensitäten gedeutet werden, das durch ein signifikant höheres Aktivitätsniveau unter MM-Bedingungen im Vergleich zu DD bestätigt wird. Für die Erzeugung dieses Mondlichteffekts sind die Komplexaugen notwendig, da bei Fliegen ohne Komplexaugen (*cli<sup>eya</sup>*) dieser Effekt nicht mehr auftritt.

Erstmals konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, wie sich der Mondlichteffekt auf das Verhalten der Oszillationen der Uhrproteine PER und TIM in den Neuronen der endogenen Uhr auswirkt. Es bestätigt sich, dass die Anwendbarkeit des oftmals zitierten 2-Oszillatoren-Modells von Pittendrigh und Daan (1976), das ursprünglich für Säuger erstellt wurde, auch für *Drosophila* zutrifft. Wie von Pittendrigh und Daan vorausgesagt, veranlasst eine verlängerte Lichtperiode, dass sich die Periodik des Morgenoszillators verkürzt, die des Abendoszillators verlängert. Die vorliegende Arbeit bestätigt prinzipiell diese Theorie, da durch das Mondlicht in der Taufliege die M-Zellen (s-LN<sub>v</sub>) eine Periodenverkürzung aufzeigen, und zumindest ein Teil der E-Zellen (die fünften s-LN<sub>v</sub>) ihre Periode verlängern. Die Ergebnisse dieser Arbeit widersprechen aber der Annahme früherer Arbeiten, dass die LN<sub>d</sub> E-Zellen sind, vielmehr verhalten sich diese als M-Zellen, zeigen jedoch einen sehr breiten Proteinpeak, der auf eine schon früher prognostizierte Heterogenität des Zellclusters schließen lässt. Weiterführende Arbeiten sind nötig, diese Diversität der Zellgruppen aufzuklären.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen auch, dass nächtliches Mondlicht nicht nur zur Synchronisation lunarer Zyklen beiträgt, sondern wohl auch die sehr lichtensitive Innere Uhr auf die Dämmerung vorbereitet, die Zeit, in der die Uhr tagtäglich neu gestellt wird, um eine präzisere Anpassung an verschiedene Photoperioden zu gewährleisten.

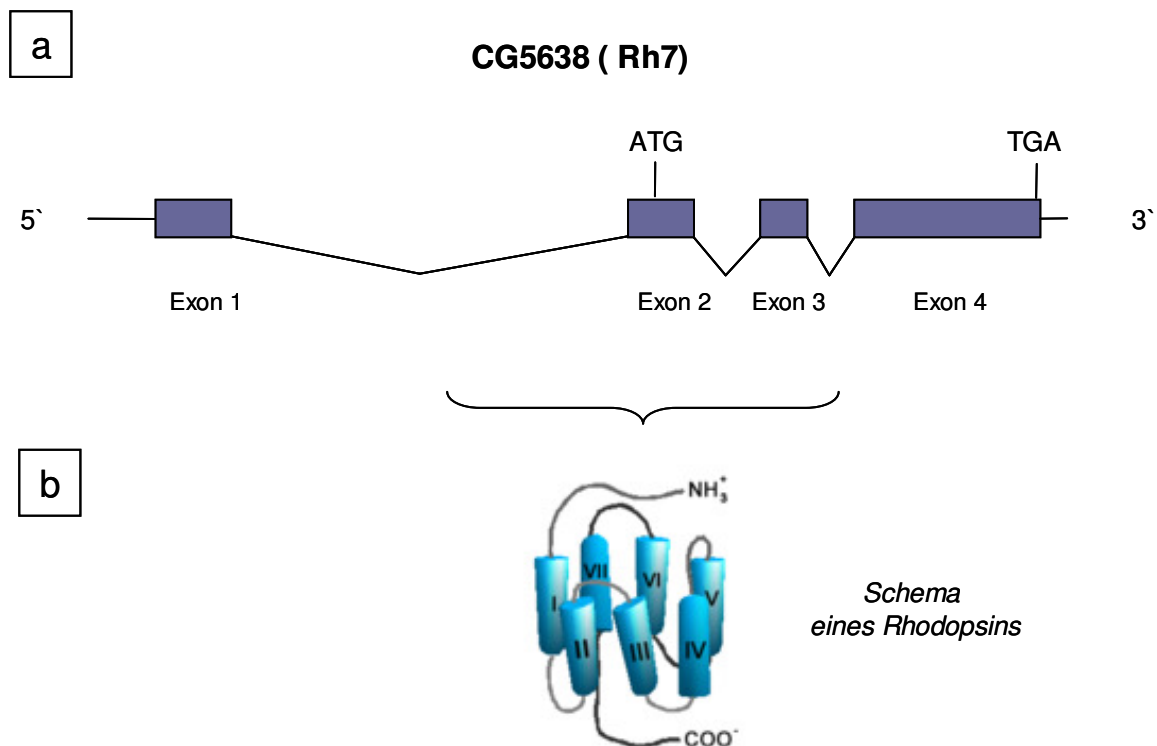
### **III. Teil 2: „Rhodopsin 7-Projekt“**

## 1. Einleitung

### 1.1. Das Protein Rhodopsin 7 (RH 7) von *Drosophila melanogaster*

Wie eingangs erwähnt ist die vollständige genomische Sequenz von *D. melanogaster* seit dem Jahr 2000 bekannt (Adams et al., 2000). Die Entschlüsselung des Genoms ist jedoch nur ein erster Schritt, der zum Verständnis der molekularen Mechanismen in den Zellen beiträgt. Von entscheidender Bedeutung zum Verständnis der Funktion einzelner Gene im Gesamtkontext eines Organismus ist die Erforschung der Funktion noch nicht charakterisierter Proteine.

Das Gen CG5638 liegt auf dem dritten Chromosom und es wird angenommen, dass das Gen für ein Protein unbekannter Funktion mit 483aa und einem Gewicht von 53,7kDa (Flybase) codiert (siehe Abb. 13). Die aufgrund Sequenzanalyse prognostizierte Proteinstruktur deutet auf das Vorhandensein einer 7 Transmembrandomäne (TMD) hin, ein Charakteristikum für G-Protein gekoppelte Proteine.



**Abb. 13: Schema des Gens CG5638 (*rh7*) (Flybase) und Modell einer 3D-Struktur eines Rhodopsins**

Exon-Intron-Struktur des Gens *rh7* (b) Modell eines Rhodopsins. Die blauen Säulen stellen schematisch die 7 (TMD) dar; Die vermutet Größe des Proteins RH7: 483aa; 53,7kDa.

Aufgrund hoher Sequenzhomologie mit den bekannten *Drosophila*-Rhodopsinen Rh1-6 wurde das Protein innerhalb der „Superfamilie“ der G-Protein gekoppelten, integralen Zellmembranproteine, den Rhodopsinen, zugeordnet, und erhielt die Bezeichnung „Rhodopsin 7“. Das Protein wurde als Rhodopsin benannt, obgleich keine Kenntnis über die Funktionalität des Proteins als Lichtrezeptor oder über eine Rolle des Proteins bei der Signaltransduktion- wie es für Rh1-6 zutrifft, vorlag.

Und genau diese Funktionalität wird bezweifelt. Zweifel bestehen, da das bei Rhodopsinen der Invertebraten in der dritten cytoplasmatischen Schleife konservierte His-Glu-Lys-Motiv, das für die Bindung des G-Proteins und damit eine mögliche Signalwirkung wichtig ist, bei RH7 fehlt (Gärtner und Towner, 1995; Gärtner, 2000; Huber, 2000).

## 1.2. RH7- der unbekannte Photorezeptor der Dorsalen Neurone?

Trotz dieser Zweifel ist RH7 der bisher vielversprechendste Kandidat auf der Suche nach dem noch unbekannten circadianen Photorezeptor in *D. melanogaster*.

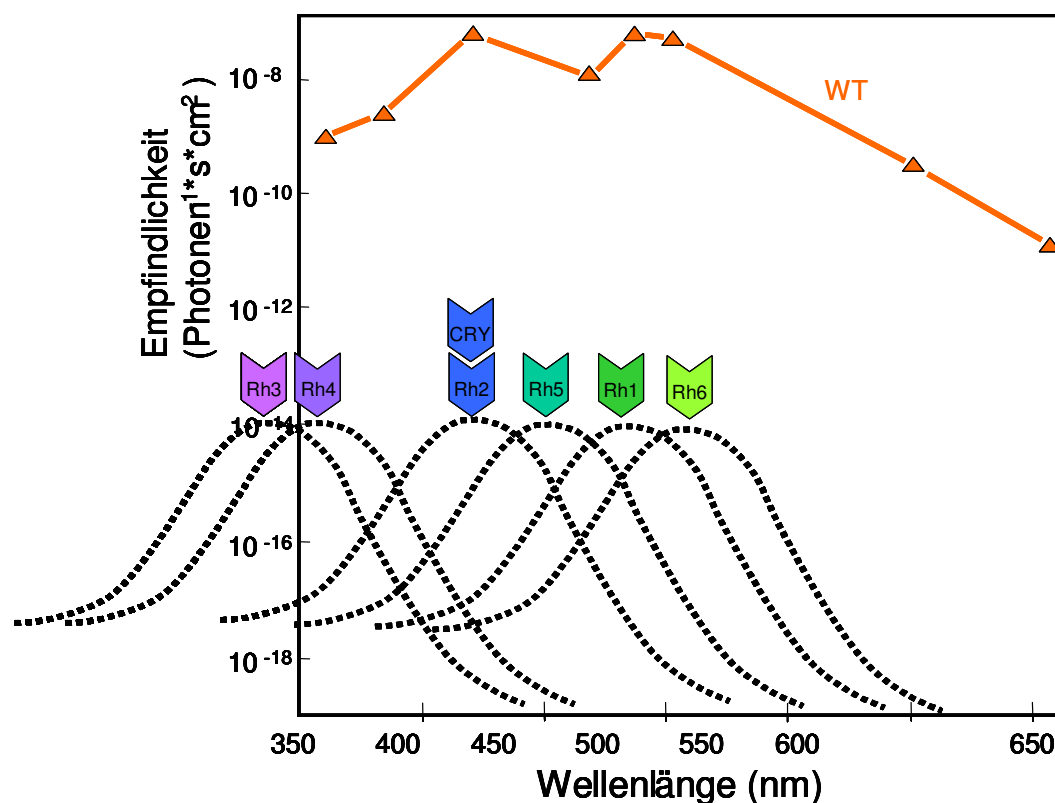
Wie eingangs beschrieben können selbst Fliegen, bei denen alle bekannten Photorezeptoren ausgeschaltet wurden, auf zyklische LD-Wechsel synchronisieren, weshalb es ein weiteres Photopigment geben muss.

Das Gen *norpA* codiert für die PLC<sub>β</sub>, die wiederum eine essentielle Komponente der *Drosophila* Phototransduktionskaskade ist (Bloomquist et al., 1991, Schneuwly et al., 1991; McKay et al., 1995). Starke Allele des mutierten *norpA*-Gens (z.B. *norpA<sup>p41</sup>*) haben die Inaktivierung der Transduktionskaskade und dadurch den Verlust der Signalwirkung zur Folge (Hotta und Benzer, 1970; Montell, 1999). Die Synchronisation des molekularen Oszillators mit dem Zeitgeber Licht durch den circadianen Blaulichtrezeptors CRY ist in der *cry<sup>b</sup>*-Mutante nicht mehr möglich (Stanewsky et al., 1998; Emery et al., 2000; Ceriani et al., 1999). In der Doppelmutante, den *norpA<sup>p41</sup>*, *cry<sup>b</sup>*-Fliegen sind also die Rhodopsin- und Cryptochrom- vermittelten Signale nicht mehr vorhanden. Und trotzdem sind diese Fliegen zu LD-Zyklen synchronisierbar, und molekulare Rhythmen in den DN der Fliegen sind nachweisbar (Stanewsky et al., 1998; Emery et al., 2000b; Helfrich-Förster et al., 2001, Veleri et al., 2003). Das ist ein Hinweis, dass das circadiane System der Taufliege durch einen unbekannten Photorezeptor, unabhängig von der PLC<sub>β</sub> oder Cryptochrom, Lichtsignale empfängt (Hall, 2000).

Des Weiteren sollte erwähnt werden, dass selbst in Fliegen in denen externe- wie interne Augenstrukturen vollkommen fehlen und darüberhinaus Cryptochrom ausgeschaltet ist (*glass<sup>60j</sup>*,

*cry<sup>b</sup>*-Fliegen) diese Fliegen also blind sein sollten, immer noch eine Reaktion auf Licht feststellbar ist (Helfrich-Förster et al., 2001). Dies ist ein weiterer Hinweis, dass selbst in diesen Fliegen noch ein unbekannter Lichtrezeptor vorhanden sein muss.

In einer Arbeit, in denen die Synchronisationsfähigkeit von Wildtyp *Canton S*-Fliegen auf Farblicht-LD-Wechsel überprüft wurde, konnte festgestellt werden, dass diese Fliegen auch im sehr langwelligen Intensitätsbereich (Rotlicht, > 550nm) zu einem LD synchronisiert werden konnten bzw. einem Shift dieses LD-Zyklus folgen konnten (Helfrich-Förster et al., 2002). Dies ist wiederum ein Hinweis, dass ein unbekannter Rotlicht-Photorezeptor existiert, der für die Lichtsensitivität von Wildtyp *Canton S*-Fliegen im langwelligen Bereich über 550nm verantwortlich sein könnte, die sich mit dem Absorptionsspektrum der bekannten Photorezeptoren, sowohl Cryptochrom, als auch den Rhodopsinen 1-6 nicht erklären lässt (siehe Abb. 14).



**Abb. 14: Illustration der spektralen Empfindlichkeit der Rhodopsine und von Cryptochrom (Nomogramme); Aktionsspektrum von Wildtyp *Canton S*-Fliegen**  
Rh: Rhodopsin; WT: Aktionsspektrum von Wildtyp-Fliegen (nach Helfrich-Förster et al., 2002).



### 1.3. Ziele des Rhodopsin 7-Projekts

Ein Ziel dieser Arbeit war zu testen, ob RH7 überhaupt exprimiert wird. Wenn RH7 exprimiert wird, so soll die Identifikation des Expressionsortes von RH7 geklärt werden.

In einem ersten Ansatz wurden von S. Veleri mehrere Rh7-GAL4 Treiberlinien, deren Expression des Transkriptionsfaktors GAL4 unter der Kontrolle unterschiedlicher Teile des Rh7-Promotors ist, hergestellt (detaillierte Information in der Dissertation von S. Veleri, 2005). In meiner Arbeit wurden die unterschiedlichen Rh7-GAL4 Fliegenstämme mit der Linie *yw;UAS-GFP* gekreuzt, um durch Analyse des GFP-Expressionsmusters den möglichen Expressionsort von RH7 identifizieren zu können. In einem weiteren Ansatz zur Aufklärung des Expressionsmusters von RH7 wurden immunohistochemische Markierungen mit Hilfe eines Antikörpers gegen RH7 (Rh7:E), der freundlicherweise von R. Paulsen (Karlsruhe) zur Verfügung gestellt wurde, durchgeführt.

Ein weiteres Ziel war die Funktionsanalyse des Proteins RH7.

Da die Analyse der Funktionalität des potentiellen Photorezeptors RH7 dadurch erschwert bzw. verhindert werden könnte, dass Proteine ähnlicher Funktion die Funktion von RH7 „verdecken“ (maskieren), und um Aussagen über Funktion des Proteins *in vivo* erzielen zu können, sollten im Sinne des „forward genetic“-Ansatzes einerseits transgene Linien hergestellt werden, die das *rh7*-Gen „überexprimieren“ und andererseits sollte in einem weiteren Ansatz eine knock-out Mutante etabliert werden. Genauer formuliert sollten transgene Linien hergestellt werden, die unter Kontrolle des Rh1-Promotors das *rh7*-Gen in R1-6 exprimieren (*yw;Rh1-Rh7;+*-Fliegen). In einem weiteren Ansatz sollten diese Fliegen in den Rh1-knock-out Hintergrund gebracht werden, so dass RH7 das einzige Protein in R1-6 ist (*yw;Rh1-Rh7;ninaE*-Fliegen). Eine Untersuchung, bei der der histologische Zustand der Rhabdomere in der Retina kontrolliert wird, soll Aufschluss darüber geben, ob RH7 in R1-6 als potentielles Photopigment den Phänotyp der Augen in *yw;Rh1-Rh7;ninaE*-Fliegen retten kann. Ableitungen des Laminapotentials von *yw;Rh1-Rh7;ninaE*-Fliegen in Elektroretinogramm-(ERG)-Studien sollen Einblick geben, ob RH7 als funktioneller Photorezeptor fungieren kann.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist es, durch Phänotypisierung der Rh7 knock-out Mutante im Vergleich mit wildtypischen Fliegen und den gerade genannten transgenen Linien Rückschlüsse auf die Funktionalität des Proteins RH7 in der circadianen Photorezeption ziehen zu können. Die Durchführung mehrerer Verhaltensexperimente soll einen vertiefenden Einblick in die potentielle Funktion von RH7 in der Schwachlichtrezeption vermitteln. Dabei ist die Durchführung von Experimenten, bei denen die Dämmerungsphasen simuliert werden, geplant. In weiteren Ansätzen soll überprüft werden, ob RH7 ein potentieller Rotlichtrezeptor ist. Dabei ist in einem ersten Ansatz ein Rotlicht-Shiftexperiment geplant, um das Resynchronisationsverhalten der Fliegen zu

einem verschobenen Rotlicht-Dunkel-Zyklus (RD) zu testen. Unterstützend soll ein weiteres Experiment, in dem nach einem RD-Zyklus Dauerrotlicht (RR) vorgesehen ist, vertiefenden Einblick in die etwaige Rotlichtsensitivität von RH7 geben.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Verbrauchsmaterialien, Standardlösungen und Chemikalien

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien und Chemikalien wurden, falls nicht gesondert aufgeführt, von den Firmen Sigma-Aldrich, Invitrogen, NEB (New England Biolabs) und ROTH bezogen. Alle Lösungen und Medien wurden, wenn nicht anders angegeben, nach den Protokollen von Ausubel et al., (1996) hergestellt.

#### 2.1.2. Mikroorganismen und Fliegenstämme

Die für die Transformation verwendeten heatshock-kompetenten Zellen waren *E. coli* XL-1 Blue von der Firma Stratagene (Sambrook and Gething, 1989). Um einen guten Überblick über die in diesem Teil der Arbeit verwendeten Fliegenstämme zu erhalten, wurden die Stämme tabellarisch aufgelistet (siehe Tab. 3).

**Tab. 3: Die Genotypen der wichtigsten in dieser Arbeit verwendeten Fliegenstämme.**

Die Rh7-UAS-Linien (Bezeichnung: Rh7:X) von S. Veleri wurden genau in der Dissertation von S. Veleri, 2005 beschrieben.

Fliegenstämme	Beschreibung	Quelle	Literatur
<i>yw</i> , +; +	Kontrollstamm, weisse Augen und helle Körperfarbe	Stammsammlung	Lindsley und Zimm, 1992
<i>Canton S</i>	Wildtypstamm	Stammsammlung	Konopka et al., 1989
<i>yw</i> ; +; <i>ninaE</i> <i>Allel: ninaE</i> <sup>17</sup>	Rhodopsin 1 Mutante	Stammsammlung	Kurada und O'Tousa, 1995
<i>yw</i> ; +; <i>srninaE</i> <i>Allel: ninaE</i> <sup>17</sup> ( <i>sr</i> : dark med. stripe thorax)	Rhodopsin 1 Mutante, weisse Augen und helle Körperfarbe	J. Bentrop, Karlsruhe	
<i>yw</i> ; <i>Bl</i> /CyO; + ( <i>bl</i> : bristled; CyO: curly)	Balancerstamm, 2. Chromosom	Stammsammlung	Lindsley und Zimm, 1992

<i>yw</i> ;+; <i>H/TM3</i> ( <i>H</i> : <i>hairless</i> ; <i>TM3</i> : <i>stubbled</i> )	Balancerstamm, 3. Chromosom	Stammsammlung	Lindsley und Zimm, 1992
<i>yw</i> ;+; <i>kiΔ2-3</i> ( <i>kiΔ2-3i</i> : <i>kinked</i> )	Stamm mit <i>P-Element</i> Transposase	Stammsammlung	Lindsley und Zimm, 1992
<i>yw</i> ; <i>Sp/CyO</i> ; <i>TM2/MKRS</i> ( <i>Sp</i> : <i>sternopleural</i> ; <i>TM2</i> : <i>Ubx</i> , <i>vergrößerte Halteren</i> ; <i>MKRS</i> : <i>stubbled</i> )	Doppelbalancerstamm, 2. und 3. Chromosom	Stammsammlung	
<a href="#"><u><i>y<sup>1</sup> w<sup>67c23</sup></i></u></a> ; <a href="#"><u><i>P{Epgy2}EY13118</i></u></a>	<i>P-Element</i> Stamm	Bloomington Stock Center: <i>BL 21406</i>	Bellen et al., 2004
<i>Rh7</i> : <i>9B/CyO</i>	<i>Rh7</i> -Gal4 Linie, Insertionsort 2. Chromosom	S. Veleri	S. Veleri, Dissertation, 2005
<i>Rh7</i> : <i>9 (X)</i>	<i>Rh7</i> -Gal4 Linie, Insertionsort X-Chromosom	S. Veleri	S. Veleri, Dissertation, 2005
<i>Rh7</i> : <i>2B/TM3</i>	<i>Rh7</i> -Gal4 Linie, Insertionsort 3. Chromosom	S. Veleri	S. Veleri, Dissertation, 2005
<i>Rh7</i> : <i>1C/TM3</i>	<i>Rh7</i> -Gal4 Linie, Insertionsort 3. Chromosom	S. Veleri	S. Veleri, Dissertation, 2005
<i>Rh7</i> : <i>9-1/CyO</i>	<i>Rh7</i> -Gal4 Linie, Insertionsort 2. Chromosom	S. Veleri	S. Veleri, Dissertation, 2005
<i>Rh7</i> : <i>1A/TM3</i>	<i>Rh7</i> -Gal4 Linie, Insertionsort 3. Chromosom	S. Veleri	S. Veleri, Dissertation, 2005
<i>Rh7</i> : <i>1B on ki</i>	<i>Rh7</i> -Gal4 Linie, Insertionsort unbekannt	S. Veleri	S. Veleri, Dissertation, 2005
<i>Rh7</i> : <i>no BL on X</i>	<i>Rh7</i> -Gal4 Linie, Insertionsort unbekannt	S. Veleri	S. Veleri, Dissertation, 2005
<i>yw</i> ; <i>UAS-GFP</i>	<i>UAS-GFP</i> Linie	Bloomington Stock Center	

### 2.1.3. *Drosophila*-Aufzuchtmedium

Das Aufzuchtmedium und die Aufzuchtbedingungen wurden bereits im ersten Teil dieser Arbeit beschrieben.

### 2.1.4. Aufzuchtmedien für Bakterien

LB-Medium: 10 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l NaCl; 3 ml/l 1N NaOH

LB<sub>amp</sub>-Medium: Autoklaviertes LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin

### 2.1.5. Oligonukleotide, Antikörper und Konstrukte

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Invitrogen und Sigma-Genosys synthetisiert und geliefert (siehe Tab. 4). Die in diesem Teil der Arbeit verwendeten Antikörper wurden in Tabelle 5 aufgelistet.

**Tab. 4: Oligonukleotide, die für die PCR und Sequenzreaktionen verwendet wurden**

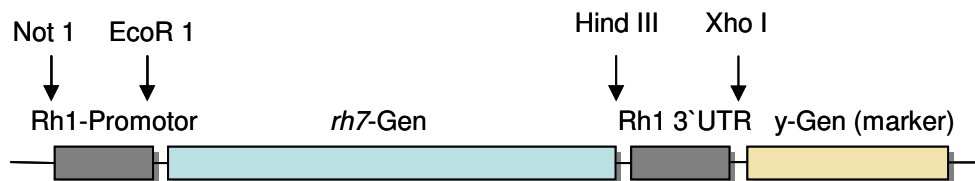
Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Verwendungszweck
Rh7:2 S	TTAACTCAATTTCGCCGATTA	Deletionskartierung
Rh7:2 AS	TCGGGAGATTCTTCGTCT	Deletionskartierung
S-Primer 2 S	TTGGAGGTCACCTTTGCTG	Deletionskartierung
Rh7 antis. Primer 2 AS	GCTCTTTGCTCGCTCGTT	Deletionskartierung
Rh7 „Exon on AS“ AS	GCCGTTTGGCGGTGTTAT	Deletionskartierung
RH7 r.o.p. S	AGGCTATTCACATTCATTACG	Deletionskartierung
RH7 r.o.p. AS	TGTTACTGGCACC GCATC	Deletionskartierung
Sense 2000 S	GTGTCAAGCCGAACAAAGC	Deletionskartierung
Sense 1000 S	AAATGTTGCCTCTGCTCACC	Deletionskartierung
Oktober 1 S	TTAGGTGACAGGGAACAA	Deletionskartierung
Oktober 2 S	AACAAAGCGTGCGGAGAT	Deletionskartierung
AS September AS	CCTCGAAAAACCATAGACCA	Deletionskartierung
Jan 2k7 S1 S	TTGTGACCAGGACCGAGAC	Deletionskartierung
Jan 2k7 S2 S	TCTTAACGGCCTAAACATGC	Deletionskartierung
Jan 2k7 AS	GACCAAGAAACACCCACTAAC	Deletionskartierung
cDNA S	AATCCATATAGAGGCGACAG	cDNA-Test; <i>rh7</i> -Gen
cDNA AS	TACATTCACTACAGGGACAAG	cDNA-Test; <i>rh7</i> -Gen

Sense 1	AACACGGTCAGAATCCACA	cDNA-Test Gen CG9760
Antisense 1	ACCCGATGTCTCGCACTAT	cDNA-Test Gen CG9760

**Tab. 5: In diesem Teil der Arbeit verwendete Antikörper**

Antikörper	Wirt	Verdünnung	Referenz/ Quelle
$\alpha$ -PER	Kaninchen	1:1000	Stanewsky et al., 1998
$\alpha$ -Rh7 (Rh7:E)	Kaninchen	1:1000	J. Bentrop, 2004
Alexa Fluor 488	Ziege; $\alpha$ -Kaninchen	1.200	Invitrogen, CA
Alexa Fluor 568	Ziege; $\alpha$ -Kaninchen	1:200	Invitrogen, CA

Das Rh1-Rh7-Konstrukt wurde freundlicherweise von J. Bentrop und R. Paulsen, Universität Karlsruhe zur Verfügung gestellt. Es handelte sich hierbei um einen *P-Element*-Vektor YC4 (Yellow Carnegie Vektor) der aus einem Konstrukt aus Rh1-Minimalpromotor, Rh7 coding sequence und der Rh1 3' UTR bestand (Abb. 15).



**Abb. 15: Graphische Darstellung der Rh1-Rh7 Klonierungskassette mit Angabe der Schnittstellen**

## 2.2. Genetische Methoden

### 2.2.1. Das UAS-Gal4-System

Das UAS-Gal4-System ist ein *in vivo* System, welches aus zwei transgenen Fliegenlinien besteht: einer sogenannten Gal4-Treiber-Linie und einer UAS-Linie. In der Gal4-Treiber-Linie wird ein natürlicherweise nicht vorkommender Transkriptionsfaktor (Gal4) aus Hefe unter der Kontrolle eines spezifischen Promotors exprimiert. Kreuzt man die Treiber-Linie mit einer bestimmten UAS-Linie, so bindet Gal4 an die UAS-Sequenzen und induziert so die Expression des

gewünschten Gens. Auf diese Weise ermöglicht dieses System *in vivo* die durch den Promotor der Treiber-Linie spezifizierte räumlich und zeitlich gerichtete Expression eines bestimmten DNA-Abschnitts oder Gens. In dieser Arbeit wurden von S. Veleri (2005) hergestellte Rh7-Gal4-Linien (unter Kontrolle des Rh7 Promoters) mit *yw;UAS-GFP* Fliegen gekreuzt (Tab. 3). Das GFP (Green Fluorescent Protein) wurde somit unter Kontrolle verschiedener Rh7-Treiberlinien exprimiert.

### 2.2.2. Keimbahntransformation und Herstellung genetisch stabiler Transformanten

Mit Hilfe des Quiagen® Plasmid Midi Kits wurde die für die Injektion in Fliegenembryos bestimmte DNA, die wie in Kapitel 2.3.2 amplifiziert wurde, aufgereinigt. Daraufhin wurde die DNA in sterilem Wasser gelöst. Nach Zentrifugation der DNA und Zugabe von 10x Injektionspuffer und Lebensmittelfarbstoff (zur Kontrolle der injizierten DNA-Lösung) wurde die DNA-Lösung auf eine Konzentration von 300ng DNA/µl eingestellt.

Nach manueller Dechorionisierung auf Klebeband und kurzer Trocknungsphase auf Silikagel wurden die Embryonen mit Voltalev Öl (Atofina) überschichtet, um eine weitere Austrocknung zu verhindern. Injiziert wurde in ca. 30-60 Min. alte *yw;+;ki Δ2-3* Embryonen (syncytiales Stadium), in zwei Ansätzen zu je 30 bzw. 80 Embryonen, die bezüglich der Transposase heterozygot waren. Die Injektion der DNA in das Polplasma erfolgte mit Hilfe von Injektionskapillaren (Eppendorf), der erforderliche Druck (etwa 1 bar) wurde mit Hilfe einer Stickstoffflasche mit Druckminderer erzeugt. Im 18°C Raum schlüpften überlebende Larven auf Apfelagarplatten. Die Larven wurden dann in Gläsern mit dem beschriebenen Fliegenbrei überführt.

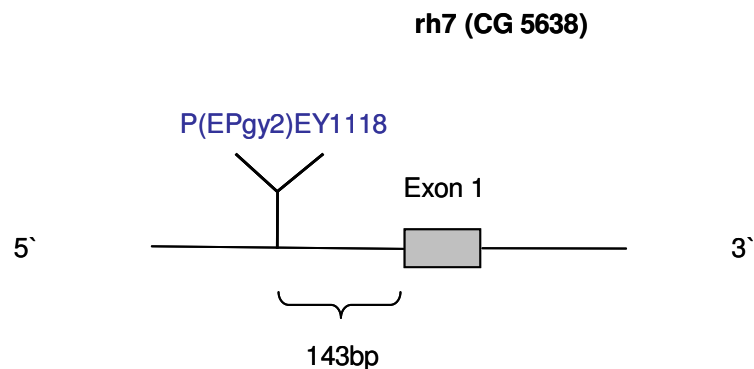
Die sich daraus entwickelnden Fliegen wurden anschließend mit dem Stamm *yw;+;+* rückgekreuzt. Die Nachkommen dieser Fliegen wurden auf dunkle Körper (Das *yellow* Gen war der Marker des *P-Elements*) hin untersucht und zum Bestimmen des Insertionschromosoms folgendermaßen weitergekreuzt.:

Fliegen mit dunklen Körpern, die auch keine Transposase enthielten (und daher nicht den Marker *ki* = *kinked* trugen), wurden entweder mit Fliegen der Balancerstämme des zweiten Chromosoms *yw;Bl/CyO;+* oder des dritten Chromosoms *yw;+;H/TM3* gekreuzt. (Fliegen, die nach wie vor den Marker „*kinked*“ trugen, wurden verworfen). Die daraus resultierenden Nachkommen mit dunklen Körpern und den jeweiligen Balancern wurden erneut mit dem entsprechenden Balancerstamm gekreuzt. Wenn die Nachkommen dieser Kreuzungen dann dunkle Körper hatten und keine Balancer mehr zu erkennen waren, konnte davon ausgegangen werden, dass sich das *P-Element* auf dem zweiten bzw. dritten Chromosom befand. Mehrere homozygote Linien mit

dem *P-Element* auf dem zweiten Chromosom (*yw;Rh1-Rh7;+*) und dritten Chromosom (*yw;+;Rh1-Rh7*) konnten so etabliert werden.

### 2.2.3. Herstellung der knock-out Mutante durch *P-Element* Remobilisierung

Um die Funktion des RH7 Proteins nachweisen zu können wurde auch eine Rh7 knock-out Linie hergestellt, um durch vergleichende Studien eines möglichen Rh7 knock-out Phänotypes mit dem Phänotyp von Wildtypstämmen Einblick in die Funktion des Proteins gewinnen zu können. Es stellte sich heraus, dass der Stamm ([\*y<sup>l</sup> w<sup>67c23</sup>\*](#); [\*P{EPgy2}EY13118\*](#)) mit einem *P-Element*-Insert in einer Entfernung von 147bp in 5' Richtung vor dem ersten Intron des *rh7*-Gens bereits existiert (Abb. 16). Dieser Stamm wurde vom Bloomington Stock Center bezogen.



**Abb. 16:** Schema, das die Lage des *P-Elements* im *rh7*-Gen (Stamm: BL 21406) darstellt.

Durch Kreuzen des Stammes BL 21406 mit dem Transposasestamm *yw;+;kiΔ2-3* wurde das *P-Element* remobilisiert. Da die Quote einer Deletion im Vergleich zu einer präzisen Excision äußerst gering ist, wurden 220 Einzelkreuzungen angesetzt. Um einer Rekombination vorzubeugen wurden die heterozygoten Männchen der F1-Generation mit Jungfrauen des Balancerstammes *yw;+;H/TM3* gekreuzt. Die F2-Generation, die nur den Balancer und helle Körper hatten wurden mit dem Balancerstammes *yw;+;H/TM3* erneut gekreuzt, um in der F3-Generation Fliegen mit dem Genotyp *yw;+;P<sup>o</sup>/TM3* zu bekommen. Die Fliegen dieses Genotyps wurden miteinander gekreuzt, um stabile, homozygote Fliegen ohne *P-Element* zu erhalten (*yw;+;P<sup>o</sup>/P<sup>o</sup>*). Daraufhin wurden Deletionskartierungen vorgenommen, um zu testen, ob es sich um Revertanten oder echte Deletionslinien handelte. Die genaue Erklärung der Deletionsstelle (mit Schema) liegt im Kapitel 3.1.2.2. und Abb. 18 vor.



#### 2.2.4. Etablierung einer doppelt homozygoten Linie des *Rh1-Rh7*-Konstrukts im *ninaE*-Hintergrund

Zur Optimierung der Funktionsanalyse des RH7 Proteins wurde der Stamm *yw*;+;*ninaE* und der Stamm *yw*;*Rh1-Rh7*;+ in den Doppelbalancerstamm *yw*;*Sp/CyO*;*TM2/MKRS* eingekreuzt. Dadurch wurden in der F1-Generation die Stämme *yw*;*Rh1-Rh7/CyO*;*TM2/MKRS* bzw. *yw*;*Sp/CyO*;*TM2/ninaE* erhalten. Die Fliegen dieser Genotypen wurden untereinander gekreuzt um in der F2- Generation homozygote Tiere der Genotypen *yw*;*Rh1-Rh7/Rh1-Rh7*;*TM2/MKRS* oder *yw*;*Sp/CyO*;*ninaE/ninaE* zu erhalten. Die F2-Generationen wurden nun gegeneinander gekreuzt, um *yw*;*Rh1-Rh7/CyO*;*TM2/ninaE* Fliegen zu erhalten. Durch erneutes Kreuzen der F3- Generation aus diesen Nachkommen konnten die Balancer ausgekreuzt werden, das Resultat war die Etablierung des doppelt homozygoten Stammes *yw*;*Rh1-Rh7/Rh1-Rh7*;*ninaE/ninaE*.

### 2.3. Molekularbiologische Methoden

#### 2.3.1. Allgemeines

Die hier beschriebenen molekularbiologischen Methoden wurden nach laborüblichen Standardmethoden (Sambrook und Gething, 1989) durchgeführt. Die Lösungen und Medien wurden, wenn nicht anders angegeben, nach den Protokollen von Ausubel et al. (1996) hergestellt.

#### 2.3.2. Klonierung, Transformation und Isolierung der Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Klonierung des im Punkt 2.1.5. beschriebenen Konstrukts wurde freundlicherweise von J. Bentrepp, Universität Karlsruhe vollzogen und in Glycerolstocks angeliefert. Die Hitzeschocktransformationen erfolgte in heatshock-kompetenten Zellen *E. coli* XL-1 *Blue* wie in Ausubel *et al.* (1996) beschrieben. Auf den Hitzeschock (42°C für 45 Sekunden) folgte eine sofortige Inkubation auf Eis für ca. 2 min. Nach einer Zugabe von 1ml LB-Medium wurde der Ansatz für eine Stunde bei 37°C gehalten und danach auf LB<sub>amp</sub>-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Isolation der DNA erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellerprotokolls des verwendeten QUIAGEN Plasmid Midi Kits.

### 2.3.3. „Single fly“ gDNA-Isolierung

Die gDNA (genomische DNA) aus einzelnen Fliegen wurde nach dem Protokoll von Gloor (1993) präpariert. Mit Hilfe einer Pipettenspitze wurde eine Fliege in einem Eppendorftube zerquetscht. 50µl Squishing Buffer wurde dazugegeben, daraufhin 20 Min. bei 37°C inkubiert und diese Reaktion durch Erhitzen auf 95°C (zwei Min.) abgebrochen. Für eine PCR wurde normalerweise 1,5-2µl gDNA als Template eingesetzt.

### 2.3.4. RNA-Isolierung und Reverse Transkription

Die Fliegen wurden in flüssigen Stickstoff getaucht und dann die Köpfe durch Vortexen von den Körpern getrennt. Auf Trockeneis wurden 80 Köpfe abgesammelt. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte nach dem TriFast®-Protokoll der Firma PEQLAB. Menge und Sauberkeit der RNA wurde durch spektrophotometrische Messung ermittelt. Aus dem Ergebnis der Messung errechnete sich die RNA- Template Menge, die für die Reverse Transkription eingesetzt wurde. Die Reverse Transkription wurde wie im QuantiTect® Reverse Transkription Handbook der Firma QUIAGEN beschrieben durchgeführt. In diesem Protokoll wird die cDNA-Synthese inklusive Entfernung genomischer DNA-Kontamination beschrieben.

### 2.3.5. Polymerase Chain Reaktion (PCR)

Die Amplifizierung spezifischer DNA Stücke erfolgte unter Verwendung von Taq<sup>+</sup>-Polymerase aus *Thermus aquaticus*. Die Reaktion erfolgte in PCR-Maschinen der Firma Biometra und im *RoboCycler Gradient 40* der Firma Stratagene. Bei Verwendung des *RoboCycler* wurden die Proben mit 25 µl Mineralöl überschichtet um ein Überkochen der Proben zu verhindern. Der PCR-Reaktionsansatz wurde in Tabelle 6 wiedergeben.

**Tab. 6: Standardreaktionsansatz (Endvolumen 25µl) und Programm der Reaktionszyklen**

1µl	Primer S	Reaktionszyklen 95°C 3 Min 95°C 1 Min. ~58°C 1 Min. 72°C 2 Min. 72°C 10 Min. <div style="display: flex; align-items: center; justify-content: center;">             } 33-35 Zyklen           </div>	
1µl	Primer AS		
0,5µl	MgCl <sub>2</sub>		
1µl	dNTPs (10mM)		
1,5µl	Template DNA		
2,5µl	10 x PCR-Puffer oder RXN-Puffer (Invitrogen)		

1µl	DNA-Polymerase (Taq <sup>+</sup> )	10°C ∞
add auf 25µl	H <sub>2</sub> O <sup>DEPC</sup>	

Die optimalen Annealing-Temperaturen wurden für jedes Primerpaar ausgetestet und entsprechend angewendet. Ebenso variierte die Zyklenzahl zwischen 33 und 35 Zyklen.

### 2.3.6. Gelelektrophorese und Nukleinsäureaufreinigung

Die elektrophoretische Auftrennung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten wurde in 0,8-2,0% TAE-Agarosegelen (Sambrook et al., 2001) bei einer Spannung von 100-130V vollzogen. Der mit der DNA interkalierende Farbstoff *EtBr* (10µl/160ml) wurde dem Gel direkt zugegeben. Die DNA-Banden wurden dadurch unter UV-Licht sichtbar. Die Fragmentgrößen konnten im Vergleich zu Banden des Längenstandards (1KB Marker, NEB) abgeschätzt werden. Die zum Sequenzieren benötigten Banden wurden ausgeschnitten und mit dem *QiaQuick Gel Extraction Kit* von QUIAGEN extrahiert.

### 2.3.7. Sequenzierung

Die gereinigten Proben wurden mit dem *BigDye<sup>®</sup> Terminator Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) sequenziert (siehe Tab. 7). Dieser Kit benutzt markierte Di-deoxy-Nukleotide als Terminatoren, dadurch kommt es zu kontrollierten Abbrüchen in der DNA. Ein spezielles Sequenzierungssystem ist dann in der Lage die Sequenz der Probe auszuwerten. Diese Auftrennung wurde in der Firma GENEART in Regensburg, (Biopark 2) ausgeführt.

**Tab. 7: Die Komponenten der Sequenzierungsreaktion**

1µl	BigDye <sup>®</sup> Premix	Reaktionszyklen 95°C 5 Min 95°C 30 Sek. 50°C 10 Sek 60°C 4 Min. 4 °C ∞ } 25 Zyklen	
4µl	5x Puffer		
1µl	Primer		
10-20ng DNA/100bp	DNA		
add auf 20µl	dd H <sub>2</sub> O		

Die Analyse der von der Firma GENEART übermittelten Daten erfolgte mit dem Programm *BioEdit* (Hall, 1999).

### 2.3.8. Deletionskartierung

Mit Hilfe von verschiedenen Primersets up- und downstream des *p-Element* Insertionsorts der Linie BL 21406 von Bloomington wurde die gDNA der einzelnen Fliegenlinien nach dem Jump-out- Experiment auf die Größe und genaue Lokalisation der Deletion hin überprüft. Die Genotypisierung erfolgte durch Sequenzermittlung wie im obigen Kapitel beschrieben. Zusätzlich wurde durch Anwendung von RT-PCR Experimenten überprüft und kontrolliert, in welchen Fliegenstämmen Rh7-mRNA nachweisbar war und ob die Deletionen auch andere Gene, die neben dem *rh7*-Gen lokalisiert sind, betrafen.

### 2.3.9. Western Blot (Semidryblot)

Die Fliegen wurden in flüssigen Stickstoff getaucht und dann die Köpfe durch Vortexen von den Körpern getrennt. Auf Trockeneis wurden 20 Köpfe abgesammelt und mit Proteinextraktionspuffer (100mM HEPES, pH 7,5; 0,5M KCL; 25% Glycerin; 50mM EDTA; 0,5% Triton X-100; 0,1M  $\beta$ -Glycerophosphat; 0,5mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  pH 11; 0,5mM PMSF; 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$  Aprotinin; 1mM DTT; 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Leupeptin; 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$  Pepstatin) homogenisiert. Nach Abtrennen fester Zellrückstände wurden die Proben 3 min. bei 95°C denaturiert, daraufhin mit Proteinladepuffer (TRIS, SDS, Glycerol,  $\beta$ -Mercaptoethanol, Bromphenolblau) auf SDS-Gele aufgetragen und aufgetrennt. Der Transfer der Proteine auf Nitrozellulosemembranen (Schleicher&Schüll) folgte dem Semi-Dry-Elektroblotting-Verfahren (Sambrook et al., 1989) in einer Fastblotkammer von Biometra. Nach Blocken der unspezifischen Bindestellen (1 Std. in 1% BSA/TBST) wurden die Membranen über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper (Rh7:E; Verdünnung 1:500 in 5 % Milchpulver/TBST) inkubiert. Die Membranen wurden gewaschen (2x 15 min. TBST) und 2-3 Stunden mit dem sekundären HRP-Antikörper bei Raumtemperatur inkubiert. Die Signaldetektion erfolgte mit dem Pierce *SuperSignal*<sup>®</sup>-Kit, die dabei entstehenden Lichtsignale wurden auf Röntgenfilm festgehalten und eingescannt (16-Bit; SW).

## 2.4. Immunohistochemie und histologische Methoden

### 2.4.1 Antikörperfärbung an wholemount-Fliegenhirnen

Diese Technik wurde im Material- und Methoden-Teil des ersten Teils dieser Arbeit ausführlich beschrieben. Das verwendete Protokoll wurde nicht verändert. Der Rh7:E Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:1000 verwendet.

### 2.4.2. Antikörperfärbung an Kryostatschnitten

Nach Betäuben der Fliegen in CO<sub>2</sub> wurden den Fliegen Rüssel, Beine und Flügel entfernt, die Körper dann in 4% PFA in PBS 4h bei 4°C fixiert. 4 Waschschrte in PBS folgten, daraufhin wurden die Fliegen über Nacht in eine 25% Saccharoselösung in PBS untergetaucht und inkubiert. Nach Abtrennen der Köpfe wurden diese auf Gewebeträgern mit *Tissue-Tek* (Sakura) eingebettet und abgekühlt. Im Kryostat (LEICA CM 3000) wurden 12µm Horizontalschnitte angefertigt, auf Objektträger aufgereiht, anschließend 5 min bei 40°C getrocknet und dann mit PBS 3x gewaschen. Nach Blocken in 5% Normal Goat Serum (NGS) für 2 Stunden erfolgte die Inkubation des primären Antikörpers Rh7:E (Verdünnung 1:1000, 3% NGS, 0,03% Triton-X in PBS) über Nacht auf 4°C. Am zweiten Tag wurde der primäre Antikörper abgezogen und die Schnitte 3x mit 0,1% Bovine Serum Albumin (BSA), 0,03% Triton-X in PBS gewaschen. Daraufhin folgte die Inkubation bei Raumtemperatur für 2 Stunden mit dem fluoreszenten sekundären Antikörper (Goat Anti Rabbit gekoppelt mit Alexa Fluor 488 (Invitrogen)). Nach 3 Waschschrten mit 0,1% (BSA) in 0,03% Triton-X in PBS wurde 2x in 0,1% BSA in PBS Lösung und 2x in PP (pH 7,4) gewaschen. Nach kurzem Antrocknen der Präparate wurden diese auf dem Objektträger mit *Vectashield Mounting Medium* (Vector Laboratories) überschichtet, mit einem Deckgläschen abgedeckt und mit *Rubber Cement* (Marabu) versiegelt.

#### 2.4.2.1. Quantifizierung der Antikörperfärbung

Das Scannen der Präparate erfolgte durch das konfokale Lasermikroskop (LSM 510 META, Carl Zeiss MicroImaging, Jena, Germany), das das Signal des fluoreszent markierten Antikörpers anzeigte. Die so erhaltenen Bilder wurden in das Programm NIH ImageJ (Wayne Rasband, freiverfügbare Software) importiert und in 8-bit RGB-Bilder konvertiert. Die Signalstärke der Färbung in den Photorezeptorzellen R1-6 und wo möglich auch R7 und R8 wurde gegenüber dem Hintergrund (Medulla) bestimmt mit der Kalkulation: Intensität (Zelle)= (Wert (Zelle) minus Hintergrund)/Hintergrund. Daraus wurde der Mittelwert, die Standardabweichung (SD) und der Standardfehler (SEM) berechnet.

### 2.4.3. Präparation und Färbung von Semidünnschnitten

Von den Fliegen wurde der Kopf mit einem Stück Thorax mit einer Rasierklinge unter Phosphatpuffer (PP; pH 7,4) auf Eis abgetrennt. In 5% Glutaraldehyd (in 0,1M PP (pH 7,4) mit 2 % Saccharose in PP) wird über Nacht fixiert. Nach 3x waschen in PBT (PP mit 0,1% Triton-X) wurden die Köpfe 2 Stunden in 1% Osmiumtetroxyd auf dem Schüttler gebracht, um bei 4°C zu kontrastieren. In einer ansteigenden Alkoholreihe (50%, 70%, 80%, 95%, 3x100% EtOH je 10 min.) wurden die Präparate entwässert und daraufhin 2x 10min in Propylenoxid inkubiert. Nach erneutem Waschen in PBT (3x) wurden die Präparate in eine 1:1 Propylenoxid/Epon-Mischung überführt. Über Nacht verdichtete sich diese. Am nächsten Tag wurden die Präparate mit einer definierten Ausrichtung der Kopfrichtung in gummierte, epongefüllte Förmchen versenkt, um die erwünschten Querschnitte durch die Retina erhalten zu können. Die Aushärtung des Kunstharzes dauerte 2 Tage bei 60°C. Die Präparatblöcke wurden nach einem Tag auf Raumtemperatur zur Nachhärtung aus den Förmchen gedrückt. Dann konnten die Blöcke mit einem Diamantmesser (Diatome Histo, Firma Schmied, Bielefeld) im Mikrotom der Firma Reichert (Modell 2040) geschnitten werden (Schnittdicke 0,2µm).

Die Schnitte wurden für 2 min. auf einer 60°C Platte mit filtrierter Färbelösung nach *Richardson* (1:1 Mischung aus 1%Methylenblau in 1% Boraxlösung mit 1% Azur-II-Lösung in H<sub>2</sub>O(dest.)) gefärbt. Nach 2x waschen in H<sub>2</sub>O(dest.) wurden die Schnitte mit DPX (DPX mountant for histology; Firma Fluka) überschichtet und mit Deckgläsern abgedeckt.

#### 2.4.3.1. Bewertung der retinalen Degeneration

Die Aufnahmen der Retinaquerschnitte wurden mit einer Mikroskopkamera (CCD Kamera, Firma Olympus, Modell DP20), montiert auf ein Mikroskop der Firma LEICA, Modell DMR, gemacht. Die so erhaltenen Bilder wurden in das Programm NIH ImageJ (Wayne Rasband, freiverfügbare Software) importiert und in 8-bit RGB-Bilder konvertiert. Auf einer definierte Fläche der Aufnahme der Retinaquerschnitte wurde ein Rechteck der Größe (area) 350000 Pixel abgegrenzt und die durch Vakuolisierung entstandenen Löcher im Gewebe (> area 500 Pixel) gezählt. Daraus wurde die durchschnittliche Flächengröße und der durchschnittliche Flächenanteil der Löcher im Vergleich zur Gesamtfläche berechnet. Aus diesen Ergebnissen wurde der Mittelwert, die Standardabweichung (SD) und der Standardfehler (SEM) berechnet. Die untersuchten Fliegen waren 21-25 Tage alt.

## 2.5. Verhaltenstests

Die Messung der Lokomotoraktivität erfolgte in Versuchsanlagen wie sie im ersten Teil dieser Arbeit bereits beschrieben wurde. Die Experimente wurden in 2 prinzipiell identischen Anlagen durchgeführt, der einzige Unterschied bestand darin, dass in der zweiten Anlage die Registrierung der absoluten Laufaktivität (Anzahl von Durchgängen durch die Lichtschranke) nach jeder Einzelminute gespeichert wurde.

### 2.5.1. Wahl der unterschiedlichen Lichtprogramme

In den Experimenten wurden verschiedene Lichtprogramme gewählt um mögliche Rolle des Proteins RH7 in der Lokomotoraktivität der wildtypischen Taufliegen im Vergleich zu Überexpressions- bzw. knock-out Mutanten testen und charakterisieren zu können. Folgende Lichtprogramme wurden gewählt:

#### *1. „Rampenexperiment“ zur Simulation von Dämmerungsperioden:*

Die Simulation der Dämmerungsphasen wurde in diesem Experiment durch logarithmische Zunahme/Abnahme der Weißlichtintensität über einen Zeitraum von 1,5 Stunden (in 1-Minuten-Schritten) bewerkstelligt. In einem weiteren Ansatz wurde Mondlicht (0,5Lux) anstelle der Dunkelphase verwendet. Ein Vergleich der Aktivitätsmusters von wildtypischen Fliegen (yw, mit Rhodopsin 7) mit Rh7 knock-out Fliegen ermöglichte es, Rückschlüsse über die mögliche Rolle von RH7 als Schwachlichtrezeptor ziehen zu können. Das verwendete Lichtprogramm wird in Tabelle 8 erläutert. Die Lichtquellen bestanden ausschließlich aus LED's (Lumitronix LED Technik, GmbH, Jungingen, Germany).

**Tab. 8: Lichtprogramm des „Rampenexperiments“**

Bezeichnung Lichtprogramm	Dauer (Tage)	Lichtintensität, Lichtprogramm Rampe
LD (Licht /Dunkel)	6	100Lux
DRLR (Dunkel/Rampe/	7	Morgens: 0-100Lux, logarithmisch steigend; Dauer d. Rampenphase: 1,5 Stunden)

Licht/Rampe)		Abends: 100-0Lux, logarithmisch abnehmend; Dauer d. Rampenphase: 1,5 Stunden)
MRLR (Mondlicht/Rampe/ Licht/Rampe)	7	Morgens: 0,5-100Lux logarithmisch steigend; Dauer d. Rampenphase: 1,5 Stunden) Abends: 100-0,5Lux, logarithmisch abnehmend; Dauer d. Rampenphase: 1,5 Stunden)
LM (Licht /Mondlicht)	7	100 Lux /0,5Lux
MM (Dauermondlicht)	~7	0,5Lux

## 2. Rotlicht-Shiftexperiment zum Test des Resynchronisationsverhaltens:

Die Fliegen wurden in einen Rotlicht-Dunkel (RD) Zyklus (12:12h) für 6 Tage gehalten. Am Folgetag wurde das Rotlicht um 6 Stunden verspätet angeschaltet, der ursprüngliche 12:12 RD Zyklus wurde nach dem Verschieben des Tagesbeginns für die restliche Dauer des Experiments beibehalten. Das Resynchronisationsvermögen der Fliegen zu dem neuen Zyklus wurde in einem ersten Experiment bei einer Rotlichtintensität von  $0,02\mu\text{W}/\text{cm}^2$  getestet. Weitere Experimente mit höheren Rotlichtintensitäten ( $0,04\mu\text{W}/\text{cm}^2$  und  $0,08\mu\text{W}/\text{cm}^2$ ) zum Testen der Dosisabhängigkeit des Resynchronisationsvermögens wurden ebenso durchgeführt. Als Lichtquellen wurden Xenophot Halogenlampen (12V, 120W; ( $\lambda = 200\text{-}380\text{nm}$ )) von Osram (Berlin, Germany) verwendet, deren Lichtstrahl durch Rotlichtfolien (Transmission 11%, E-colour # 182 light red,  $\lambda > 580\text{nm}$ , ROSCO Laboratories, London, U.K.) geleitet wurde.

## 3. „Dauerrotlichtexperiment“

In der ersten Woche wurden die Fliegen in einem RL-Zyklus synchronisiert. Die Rotlichtintensität war  $203,4\mu\text{W}/\text{cm}^2$ , die Intensität des Weisslicht war  $29,28\mu\text{W}/\text{cm}^2$ . Danach wechselte das Lichtprogramm auf RR (Dauerrotlicht) für die restliche Zeit (etwa 3 Wochen). Es wurden wildtypischen Fliegen *yw;+;+* und Rh7 knock-out Fliegen getestet, um Aussagen über eine mögliche Funktion von RH7 als Rotlichtrezeptor treffen zu können. Die Lichtquellen bestanden ausschließlich aus LED's (Lumitronix LED Technik, GmbH, Jungingen, Germany). Die Rotlicht-LED's hatten eine Wellenlänge von 625-630 nm.



### 2.5.2. Auswertung der Lokomotoraktivität

Die Auswertung der Rohdaten des Shiftexperiment zum Test des Resynchronisationsverhaltens erfolgte wie im ersten Teil dieser Arbeit beschrieben. Die anderen Verhaltensexperimente wurden in einer neueren Versuchsanlage aufgezeichnet. Die Rohdaten wurden als Textfiles abgespeichert. Im Programm Microsoft Excel (*Microsoft*) konnten diese Daten (Graphen) durch freundlicherweise von Ch. Helfrich-Förster und T. Yoshii zur Verfügung gestellte Vorlagen bearbeitet werden. Die Ermittlung der Aktivitätsmaxima (Aktivitätspeaks), die Erstellung eines repräsentativen Durchschnittstags (mehrerer ausgewählter Tiere), die Analyse der Periodizität und das Ermitteln der Aktivitätsmengen in ausgewählten Lichtphasen wurde dadurch bewerkstelligt. Die graphische Darstellung der Daten in Aktogrammen wurde im Programm El Temps (A. Diez-Noguera, Barcelona, Spanien, 1999) vollzogen.

## 2.6. Elektoretinogramm (ERG)-Analyse

Die ERG-Studien wurden von Pia Gartmeier im Rahmen einer Zulassungsarbeit durchgeführt. Der Taufliege wurde die indifferente Elektrode (Referenzelektrode) in den Thorax des Tieres versenkt. Zur Ableitung des Elektoretinogramms wurde eine mit Ringerlösung gefüllte Glaskapillare (differente Elektrode) mittels eines geerdeten Mikromanipulators auf das Auge der Fliege aufgesetzt. Dadurch wurde die Messung des sog. Laminapentials, die Ableitung der Photorezeptoren 1-6, gewährleistet. Eine elektrostatische Ablenkung der Messung durch Ausseneinflüsse wurde durch das Anbringen von Abschirmblöcken verhindert. Sowohl die indifferente als auch die differente Elektrode waren mittels eines Vorverstärkers mit einem PC und dem entsprechenden Programm zur oszillatorischen Darstellung *Easy Logger for DS1M12* (PC Data logging Software by USB Instruments) verbunden, das die Reaktionen des Fliegenauges digital aufzeichnete. Die Lichtquelle war eine Richtleuchte von Spindler & Hoyer (Göttingen) deren Lichtintensität über Graufilter variiert wurde. Die Lichtreize mit einer Dauer von 200ms wurden von dem Stimulator *Grass S44* vermittelt.

Nähere Informationen über den Experimentaufbau sowie eine genaue Beschreibung der Durchführung werden in der Zulassungsarbeit von P. Gartmeier (Fertigstellung voraussichtlich Frühjahr 2008) beschrieben.

## 2.7. Datenbanksuche

Um Protein- und DNA-Sequenzen miteinander vergleichen zu können, und um Daten über das *rh7*-Gen bzw. das Protein RH7 zu erlangen, wurden Algorithmen folgender Internetdatenbanken verwendet:

<i>FlyAtlas: The Drosophila adult gene expression atlas</i>	<a href="http://flyatlas.org/atlas.cgi">http://flyatlas.org/atlas.cgi</a>
<i>Flybase</i>	<a href="http://flybase.bio.indiana.edu/">http://flybase.bio.indiana.edu/</a>
<i>ExPASy Proteomi Canton S Server</i>	<a href="http://www.expasy.ch">http://www.expasy.ch</a>
<i>National Center for Biotechnology Information</i>	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a>
<i>JustBio (Bioinformati Canton S)</i>	<a href="http://www.justbio.com/index.php">http://www.justbio.com/index.php</a>

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Die Etablierung transgener Linien und RH7 Mutanten zur Funktionsanalyse des RH7 Proteins

##### 3.1.1. Herstellung transgener Linien und von RH7 Mutanten

Der Nachweis bzw. die Charakterisierung einer möglichen physiologischen Funktion des Proteins RH7 im Organismus könnte dadurch erschwert werden, dass die bekannten Rhodopsine, im Speziellen Rh1, in größeren Mengen exprimiert werden, und dadurch die Funktion von RH7 „verdecken“ (maskieren). Dies könnte die Funktionsanalyse von RH7 erschweren bzw. verhindern. Um dennoch eine Möglichkeit zur Analyse der Funktion des Proteins *in vivo* erzielen zu können, wurde im Sinne des „forward genetic“-Ansatzes eine transgene Linie hergestellt, in der das *rh7*-Gen unter Kontrolle eines starken Promotors exprimiert wurde, d.h. also erheblich mehr RH7-Protein gebildet wurde.

Hierfür wurde der Rh1-Promotor verwendet. Mehrere homozygote Linien mit dem *P-Element* auf dem zweiten Chromosom (*yw;Rh1-Rh7;+*) und dritten Chromosom (*yw;+;Rh1-Rh7*) konnten so etabliert werden. Insgesamt konnten 12 Linien etabliert werden, wobei das Konstrukt in 6 Linien auf dem zweiten Chromosom, in 5 Linien auf dem dritten Chromosom und in einer Linie im ersten Chromosom lokalisiert war. Im Kontrast dazu wurde in einem weiteren Ansatz eine Rh7 knock-out Mutante etabliert.

Zuerst wurde durch RNA-Isolierung und RT-PCR-Experimente überprüft, ob durch die Insertion des *P-Elements* im Stamm BL 21406 im Promotorbereich des *rh7*-Gens die Transkription von Rh7-mRNA noch gewährleistet war. Es stellte sich heraus, dass die Transkriptionsrate im Vergleich zu Wildtypfliegen verringert war, das *P-Element* im Promotorbereich des *rh7*-Gens jedoch nicht zu einem Expressionsstop führte (siehe Abb.19). Daher wurde versucht durch ein *P-Element* jump-out Experiment das *P-Element* zu remobilisieren, um eine Rh7 knock-out Mutante herzustellen. Da die Quote einer Deletion im Vergleich zu einer präzisen Excision äußerst gering ist, wurden 220 Einzelkreuzungen angesetzt. Es konnten 81 Linien isoliert werden. Daraus wurden homozygote Deletionslinien (Fliegen ohne *P-Element*) hergestellt. Daraufhin wurden Deletionskartierungen vorgenommen, um zu testen, ob es sich um Revertanten oder echte Deletionslinien handelte (siehe Kapitel 3.1.2.2.).

Das Gen *ninaE* codiert für Rh1, das in den Rezeptorzellen 1-6 lokalisiert ist. Mutationen in diesem Gen führen zu einer Degeneration der Rhabdomere dieser Rezeptorzellen (Kumar and

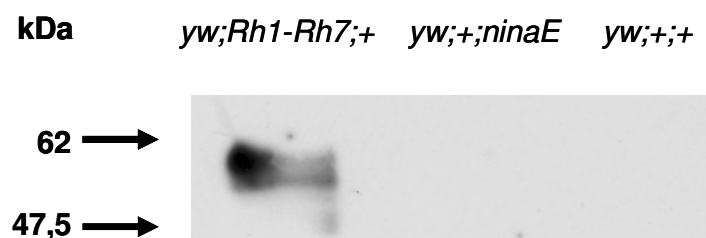
Ready, 1995). Es wurde gezeigt, dass andere funktionelle Rhodopsine, wie z.B. Rh5 getrieben vom Rh1-Promotor die Rhabdomerdegeneration verhindern konnte (Chou et al., 1996).

Es stellte sich die Frage, ob RH7, ebenso getrieben vom Rh1-Promotor, fähig war, die Funktion von Rh1 zu übernehmen. Der Stamm *yw;Rh1-Rh7;ninaE* wurde daraufhin etabliert.

### 3.1.2. Charakterisierung der transgenen Linien und der RH7 Mutante

#### 3.1.2.1. Bestätigung der Überexpression des RH7 Proteins durch Western Blot-Analyse

Mit Anfertigung von Western Blots (Semi dry blots) wurde versucht, die Ergebnisse der Erhöhung der RH7-Proteinmenge in den „Rh1-Rh7-Überexpressionslinien“ zu bestätigen. Darüberhinaus gaben diese Experimente Aufschluß, inwieweit der Antikörper auch denaturiertes RH7-Protein detektierte. Es wurden in einem ersten Ansatz 20 Fliegenköpfe der Rh1-Rh7-„Überexpressionslinie“ (Linie 22), des Referenzstammes *yw;+;+* und *yw;+;ninaE* abgesammelt, die Proben aufbereitet und die Proteine bei 95°C 3min. denaturiert. Nach Anwendung des Chemolumineszenz-Verfahrens wurden die Filme entwickelt, die Ergebnisse eingescannt. Es zeigte sich, dass nur bei der Rh1-Rh7-„Überexpressionslinie“ eine Bande auf einer Höhe von etwa 50-55 kDa detektierbar war, auch nach sehr langer Belichtungszeit konnte keine Signale für die beiden Referenzlinien *yw;+;+* und *yw;+;ninaE* nachgewiesen werden (siehe Abb. 17). Das RH7-Protein weist ein Gewicht von 53,7 kDa auf (Flybase), die Höhe der Bande des detektierten Proteins könnte mit dem berechneten Gewicht des Proteins übereinstimmen. Es kann überdies angenommen werden, dass die RH7 Menge in den Referenzstämmen unter der Detektionsgrenze lag.



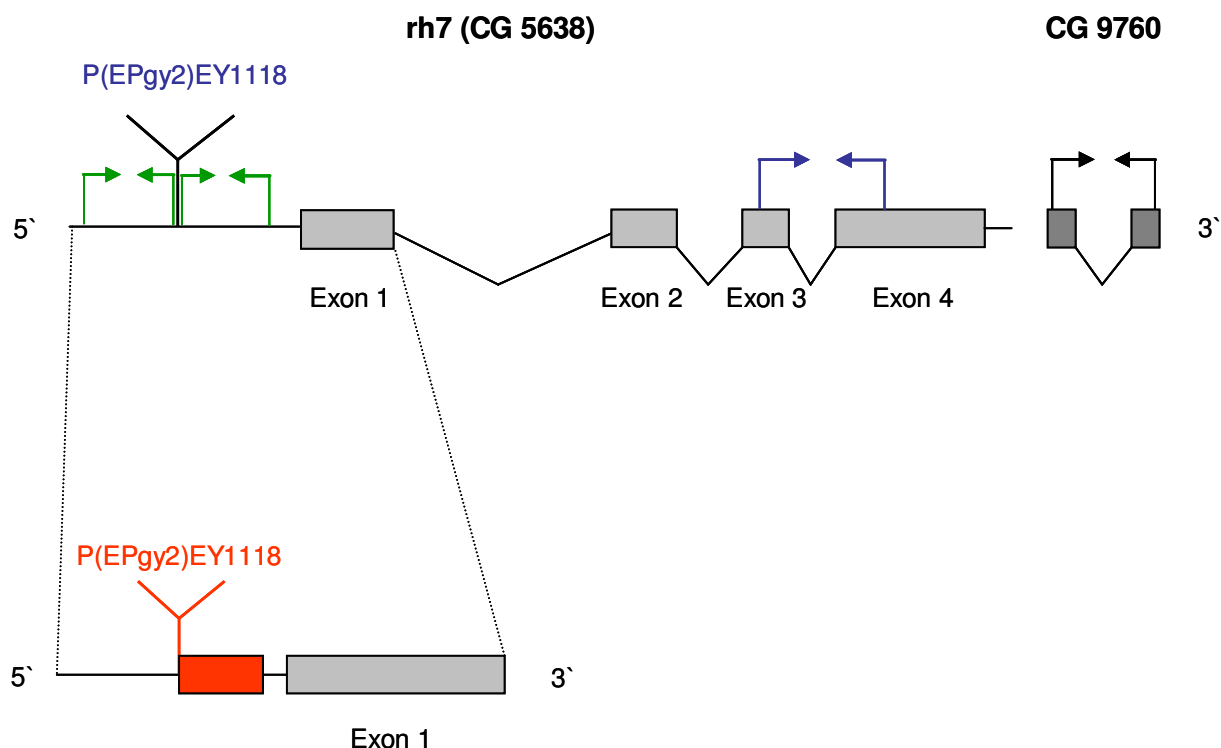
**Abb. 17: Detektion des RH7 Proteins in Fliegenköpfen durch Western Blot Analyse**

Ein Signal wurde nur für die Rh1-Rh7-„Überexpressionslinie“ (Linie 22) detektiert, ein Signal in den Referenzlinien *yw;+;+* und *yw;+;ninaE* konnte nicht ermittelt werden. Die Höhe der Bande stimmt mit dem berechneten Gewicht des RH7 Proteins von 53,7 kDa überein. Lage der Pfeile: Höhe der Banden des Markers (nicht gezeigt).

Das Experiment konnte jedoch nicht repliziert werden. Das Versuchsprotokoll wurde daher für weitere Western Blots verändert. Durch Erhöhung der eingesetzten Proteinmenge (die Proteine von 50 und 90 Köpfen) sowie Veränderungen in der Behandlung der Proben wurde in etwa 25 weiteren Ansätzen kein Signal nachgewiesen. Dieses Ergebnis bestätigt Erkenntnisse von J. Paulsen, Karlsruhe, der mit diesem Antikörper keine eindeutigen Signale auf Western Blots nachweisen konnte (persönliche Mitteilung).

### 3.1.2.2. Verifizierung der RH7 Mutante durch Sequenzanalysen und Deletionskartierung

Durch PCR-Experimente wurden die 81 homozygoten Deletionslinien daraufhin getestet, ob beim Herauslösen des *P-Elements* aus dem Genom der Fliegen eine präzise Exzision stattfand oder ob DNA-Fragmente aus dem Genom durch die *P-Element* Mutagenese mit herausgelöst wurden. Durch Wahl von Primerpaaren angrenzend in 5' und 3' Richtung des ursprünglichen *P-Element* Insertionsorts (Abb.18) konnte nachgewiesen werden, dass 2 Deletionslinien (Linien 35 und 47) entstanden. Die Deletionen in beiden Linien erstreckten sich in 3' Richtung vom *P-Element* Insertionsort. Die restlichen Linien waren Revertanten, da durch präzise Exzision des *P-Elements* die Sequenz des *rh7*-Gens nicht modifiziert wurde.

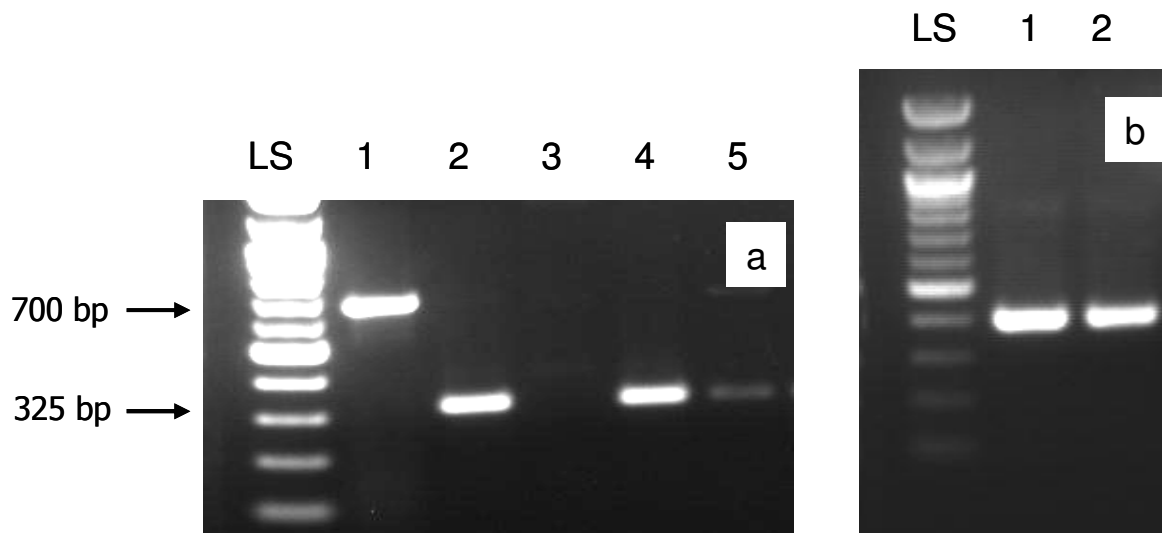


**Abb. 18: Schema des *rh7*-Gens mit Anzeige des *P-Element* Insertionsortes; Schema des Gens CG9760**

**Oben:** Exon-Intron Schema des Gens *rh7* mit Anzeige des *P-Element* Insertionsortes in 5' Richtung vor dem ersten Exon, und Exon-Intron Schema des in 3' Richtung vom *rh7*-Gen gelegene Nachbargens CG9760. Grüne Pfeile: Lage der Primer, die zur Untersuchung der Deletionsgrösse nach der *P-Element*-Mutagenese verwendet wurden. Blaue Pfeile im Schema des Gens *rh7*: Primerpaar, das in RT-PCR-Experimenten zur Überprüfung der Transkription des *rh7*-Gens verwendet wurde. Pfeile im Gen CG6790: Lage der Primer, mit deren Hilfe durch die Amplifikation von Fragmenten in der Linie *yw*;+;+ und in der knock-out Mutante verifiziert wurde, dass nur das *rh7*-Gen in der knock-out Mutante deletiert wurde. **Unten:** Vergrößerte Ansicht des *rh7*-Gen Schemas des Promotorbereichs und des ersten Exons. Der rote Balken markiert den durch *P-Element*-Mutagenese deletierten Bereich (inklusive *P-Element*) von 187bp der Linie 35.

Zur Kartierung der Deletion bzw. um zu testen, ob die Transkriptionsrate des *rh7*-Gens durch die Deletionen in der Linie 35 und 47 herabgesetzt bzw. verhindert wurde, wurde die RNA isoliert, durch RT-PCR-Experimente in cDNA umgeschrieben und anschliessend PCR-Experimente mit den Primern 3 und 4 durchgeführt (Abb.18). Dabei ergab sich, dass bei der Linie 35 in 5' Richtung des *P-Element* Insertionsortes eine Deletion von 187 bp entstand (Abb.18). Zur Kontrolle der Funktionalität der Primer wurde in einer Bande die gDNA von *yw*;+;+-Fliegen eingesetzt. Es wurde bestätigt, dass im Vergleich zur Bande, die aus dem cDNA-Template amplifiziert wurde, ein Größenunterschied von etwa 370bp bestand, der mit der Größe des Introns, das sich zwischen dem Primerpaar befand, identisch ist. Durch die Deletion im Promotorbereich des *rh7*-Gens in der Linie 35 wurde keine Verringerung der Transkriptionsrate des Gens registriert. Die Bande war mit der Signalstärke der Bande der Revertantenlinie 13 in Abbildung 19 vergleichbar.

Die Deletion der Linie 47 erstreckte sich vom *P-Element* Insertionsort in 3' Richtung über das ganze *rh7*-Gen. Der Bruchpunkt zwischen dem *rh7*-Gen und des sich in 3' Richtung anschließenden Gens CG9760 konnte in den durchgeführten PCR-Reaktionen nicht bestimmt werden. Daher konnte keine Sequenzanalyse vorgenommen werden. In RT-PCR Experimenten deutete die mit dem Wildtyp vergleichbare helle Bande darauf hin, dass das Gen (CG9760) von der Deletion nicht betroffen war (siehe Abb. 18 und 19). Dies bestätigt, dass in der Linie 47 lediglich das *rh7*-Gen deletiert wurde.



**Abb. 19: PCR-Experimente zur Überprüfung der Transkriptionsrate des *rh7*-Gens**

(a) Die Lage des Primerpaares wurde in Abb. 18 mit blauen Pfeilen schematisch angegeben. LS: Längenstandard. **Bahn 1:** Amplifiziertes Fragment aus der genomischen DNA von *yw*;+;+ Fliegen. Größe: etwa 700bp, die dem 370bp Intron und Teilen der Exons 3 und 4 entsprechen (Abb. 18). **Bahn 2:** Fragment, amplifiziert aus dem cDNA-Template von *yw*;+;+ Fliegen mit einer Größe von etwa 325bp. **Bahn 3:** Verifizierung der knock-out Mutante (Linie 47): keine Bande, da das Gen nicht transkribiert wird. **Bahn 4:** Fragment, amplifiziert aus der cDNA einer Reverante, das der Signalstärke der Linie 35 entspricht. **Bahn 5:** Signal der *P-Element* Linie BL 21406, das auf eine verminderte Transkriptionsrate des *rh7*-Gens hinweist. (b) Die Lage des Primerpaares wurde in Abb. 18 schematisch angegeben. **Bahn 1:** Amplifiziertes Fragment aus der cDNA von *yw*;+;+ Fliegen. **Bahn 2** Bande, amplifiziert von der cDNA der knock-out Mutante (Linie 47), das eine wildtypische Transkriptionsrate des Gens CG9760 vermuten lässt.

### 3.2. Bestimmung des RH7-Expressionsmusters

#### 3.2.1. Expressionsanalyse von RH7 durch Rh7-Gal4/UAS-GFP Linien

Mehrere Rh7-GAL4 Treiberlinien wurden von S. Veleri hergestellt (detaillierte Information in der Dissertation von S. Veleri, 2005), deren Expression des Transkriptionsfaktors GAL4 unter der Kontrolle eines 1,4kb-Fragments des Rh7-Promotors war. In dieser Arbeit wurden die Rh7-GAL4 Fliegen mit der Linie *yw*;UAS-GFP gekreuzt, das GFP wurde somit ektopisch unter Kontrolle der Rh7-Treiberlinien exprimiert.

Mikroskopische Analysen von wholemount Gehirnpräparaten wiesen deutliche Unterschiede im Expressionsmuster des GFP in den verschiedenen Rh7-GAL4/UAS-GFP Linien auf. Es stellte sich heraus, dass in den verschiedenen Linien unterschiedliche Zellen, vor allem in der Nähe der Dorsalen Neurone im Zentralgehirn, und im Bereich des subesophagialen Ganglions gefärbt waren. Es konnten auch vereinzelt Markierungen in den Ocellen, in Gliazellen der optischen Loben und im Ösophagus nachgewiesen werden. Übereinstimmende Expressionsmuster, die in mehreren Linien beobachtbar waren, traten kaum auf. Es sei darauf hingewiesen, dass Signale in den Ocellen und im subesophagialen Ganglion in mehreren Linien zu sehen waren, ob es sich in

den verschiedenen Linien um identische Zellen (z.B. im subesophagialen Ganglion) handelte, konnte nicht gesichert geklärt werden. Die GFP-Expressionsmuster der einzelnen Linien sind übersichtlich in der Tabelle 9 aufgelistet, ausgewählte Färbungen von Präparaten wurden in Abb. 20 abgebildet.

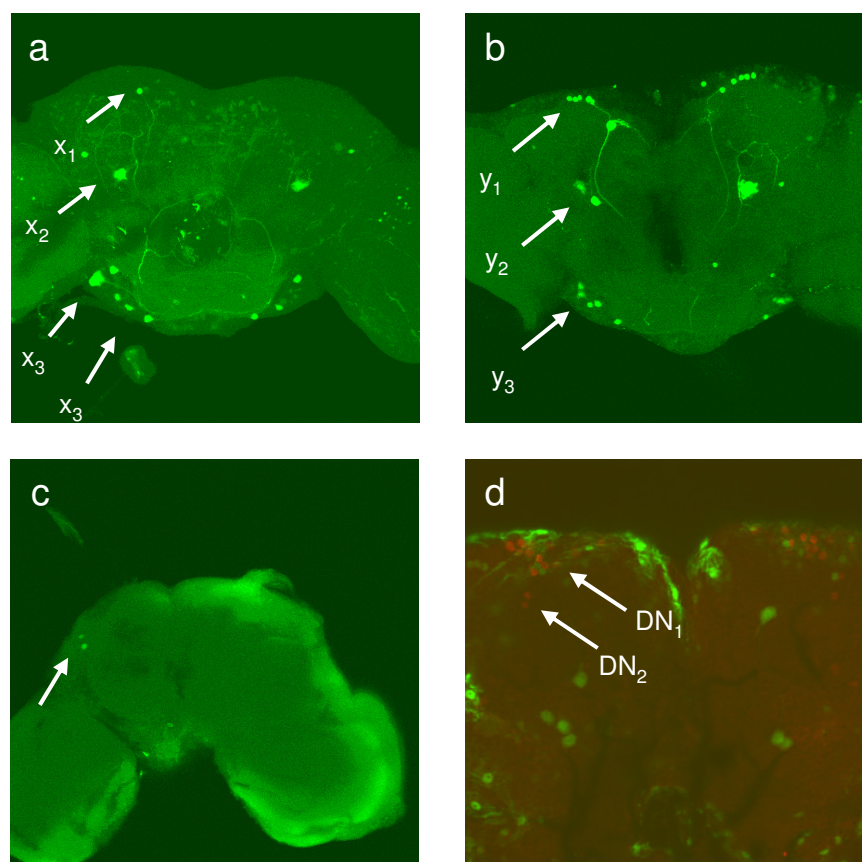
**Tab. 9: GFP-Expressionsmuster verschiedener Rh7-GAL 4/UAS-GFP Linien.**

Auflistung der gekreuzten Linien mit Angabe der Anzahl der Präparate mit charakteristischer GFP-Färbung. Es konnten kaum eine Übereinstimmung im Expressionsmuster der einzelnen Rh7-GAL4/UAS-GFP Linien nachgewiesen werden. Auch innerhalb der einzelnen Stämme war das Expressionsmuster nicht stabil und unterlag zum Teil einer hohen Varianz. Ein hoher Anteil der Hirne wies keine GFP-Färbung auf.

Fliegenstamm (Rh7-Gal4 Linie)	Durchschnittliche Anzahl der gefärbten Präparate	Beschreibung des GFP-Expressionsmusters
<i>UAS-GFP x Rh7: 9B/ CyO</i>	~10% der Präparate 1 Präparat	- 2 Zellen im subesophagialen Ganglion - Gliazellen im Neurolemm der opt. Loben
<i>UAS-GFP x Rh7: 9 (X)</i>	~40% der Präparate	- wenige Zellen im subesophagialen Ganglion - Einzelzellen im Bereich der DN <sub>1</sub> , LN <sub>d</sub>
<i>UAS-GFP x Rh7: 2B/ TM3</i>	~60% der Präparate	- bis 8 Zellen im subesophagialen Ganglion - Einzelzellen im Bereich der DN <sub>1</sub> , LN <sub>d</sub>
<i>UAS-GFP x Rh7: 1C/ TM3</i>	~95% der Präparate  2 Präparate	- bis 4 Zellen im subesophagialen Ganglion - Zellcluster im Bereich der DN, LN <sub>d</sub> mit Kommissuren - schwache Färbung in den Ocellen
<i>UAS-GFP x Rh7: 9-1/ CyO</i>	~70% der Präparate	- bis 8 Zellen im subesophagialen Ganglion - Einzelzellen im Bereich der DN <sub>1</sub> , LN <sub>d</sub> - schwache Färbung im Ösophagus
<i>UAS-GFP x Rh7: 1A/ TM3</i>	~60% der Präparate	- wenige Zellen im subesophagialen Ganglion - Einzelzellen im Bereich der DN <sub>1</sub>
<i>UAS-GFP x Rh7: 1B on ki</i>	~60% der Präparate	- bis 4 Zellen im subesophagialen Ganglion - Einzelzellen im Bereich der DN <sub>1</sub> , LN <sub>d</sub>
<i>UAS-GFP x Rh7: no BL on X</i>	5-10% der Präparate 2 Präparate	- wenige Zellen im subesophagialen Ganglion - Gliazellen im Neurolemm der opt. Loben



Eine vermutete Expression von GFP in den Dorsalen Uhrneurone ( $DN_1$  und  $DN_2$ ) wurde durch Markieren der Dorsalen Neurone durch Antikörperfärbung mit  $\alpha$ -PER überprüft. Dabei wurde nur die Linie *UAS-GFPxRh7:1C/TM3* getestet, die die konstanteste GFP-Färbung von Zellen im Bereich der DN aufwies. In diesem Experiment konnte in keinem Neuron eine Koexpression von PER und GFP festgestellt werden (Abb. 20), was jedoch nicht zwingend ausschliessen lässt, dass keine Koexpression- beispielsweise in anderen Rh7-GAL4/UAS-GFP Linien- existiert. In nur einem Präparat war eine Koexpression von GFP und PER in den Ocellen nachweisbar (Daten nicht gezeigt). In zwei weiteren Präparaten des gleichen Experimentansatzes wurde keine Doppelmarkierung festgestellt.



**Abb. 20: Expressionsmuster von GFP in *Drosophila*-Ganzhirnpräparaten getrieben unter der Kontrolle verschiedener Rh7-GAL4 Linien.**

(a) Grün: GFP-Expressionsmuster der Linie *UAS-GFPxRh7:1A/TM3*: Färbung von Zellen in der Nähe der Dorsalen Neurone ( $x_1$ ), in Zellen des dorsolateral des Ösophagus (posterioren Bereich) ( $x_2$ ), und im Bereich des subesophagealen Ganglions ( $x_3$ ). (b) GFP-Färbung der Linie *UAS-GFPxRh7:1C/TM3*: Färbung von Zellen in der Nähe der Dorsalen Neurone ( $y_1$ ), in Zellen dorsolateral des Ösophagus (posterioren Bereich) ( $y_2$ ), und im Bereich des subesophagealen Ganglions ( $y_3$ ). (c) GFP-Expressionsmuster der Linie *UAS-GFP x Rh7:9(X)*: gefärbte Zellen im Bereich der  $LN_d$ . (d) Linie *UAS-GFPxRh7:1C/TM3*: Ausschnitt aus dem Dorsalen Zentralgehirn: Die rot markierten Zellen sind mit  $\alpha$ -PER gefärbte Dorsale Uhrneurone ( $DN_1$  und  $DN_2$ ), eine Koexpression mit GFP (grün) in den Dorsalen Neuronen konnte nicht nachgewiesen werden.

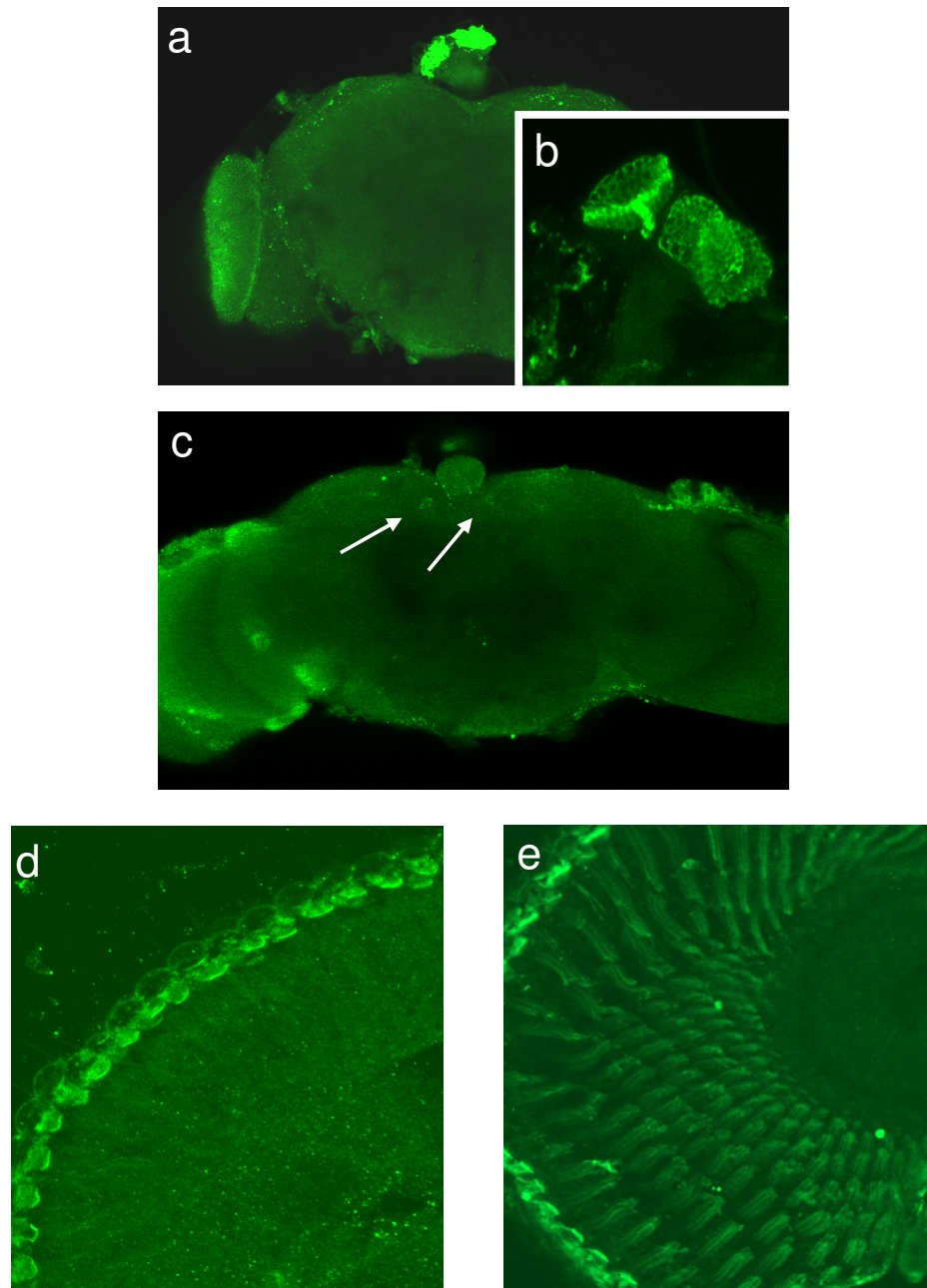
### 3.2.1.1. Bestimmung des RH7-Expressionsmusters mit Antikörpern im Wildtyp

Zur Aufklärung des Expressionsmusters von RH7 wurde auch ein Antikörper gegen Rh7 (Rh7:E), der freundlicherweise von R. Paulsen (Karlsruhe) zur Verfügung gestellt wurde, verwendet. Es handelte sich um ein Antiserum gegen das Rh7-Peptid, T412–431, das an eine Dihydrofolatreduktase gekoppelt wurde. Es lag keine genauere Charakterisierung des Antikörpers vor, es wurde lediglich darauf hingewiesen, dass mit diesem Antikörper keine eindeutigen Signale auf Western Blots nachzuweisen waren. In dieser Arbeit wurden neben wholemount Gehirnpäparaten auch Gefrierschnitte (Kryostatschnitte) kompletter Taufliiegenköpfe der Linie *yw;+;+* angefertigt und mit dem Antikörper gefärbt. Die Verwendung von Gefrierschnitten bot den Vorteil, auch die Komplexaugen und Ocellen anfärben zu können, da diese Strukturen bedingt durch das Herauslösen des Gehirnes aus der Schädelkapsel in den meisten wholemount-Präparaten fehlten. In nur wenigen wholemount-Gehirnen konnten die Ocellen erhalten werden. Die Ocellenfärbung war besonders interessant, da diese bei einigen der Rh7-GAL4/UAS-GFP wholemounts angefärbt wurden.

Tatsächlich zeigte es sich, dass der Antikörper Rh7:E in den Ocellen der wholemount-Präparate stets ein sehr starkes Signal aufzeigte (Abb. 21). Ander als in den Reporterlinien wurden darüberhinaus in nur etwa 20% der Gehirne schwache Färbungen von je einer Zelle pro Hemisphäre, dorsal im posterioren Bereich des *pars intercerebralis* erkennbar. Diese Färbung war jedoch nicht konsistent.

In den Gefrierschnitten zeigte sich, dass durch den Antikörper die Rhabdomere der Ommatidien, deren Kristallkegel und auch Ocellen gefärbt wurden (Abb. 21). Kontrollfärbungen ohne primären Antikörper ließen erkennen, dass das Signal der Kristallkegel ein unspezifisches Signal war, da der sekundäre fluoreszente Antikörper in diesen Strukturen unspezifisch angereichert wurde (Abb. 21). Das Signal in den Rhabdomeren fehlte jedoch in diesen Kontrollfärbungen. Damit konnte auch die Markierung in den Kristallkegeln in den Schnitten mit primärem Antikörper (Rh7:E) als unspezifisches Signal gedeutet werden, das Signal in den Rhabdomeren der Ommatidien in der Retina als eine spezifische Färbung des Rh7:E Antikörpers (Abb. 21).

Da keine Charakterisierung des Antikörpers Rh7:E vorlag und der Antikörper ungeeignet für Western Blot Analysen erschien, wurde die Herstellung eines neuen Anti-RH7-Antikörpers bei der Firma *Davids Biotechnologie* (Regensburg) in Auftrag gegeben. Die gegen ein Epitop des im Rh7-Peptid T312-328 gerichteten affinitätsgereinigten IgG-Seren aus den Wirtsorganismen Meerschweinchen und Huhn wurden auf Gefrierschnitten und wholemount-Präparaten wildtypischer Fliegen und Überexpressionslinien in den Verdünnungen von 1:10; 1:100 und 1:1000 getestet. Es konnte keine spezifische Färbung von Zellen festgestellt werden.



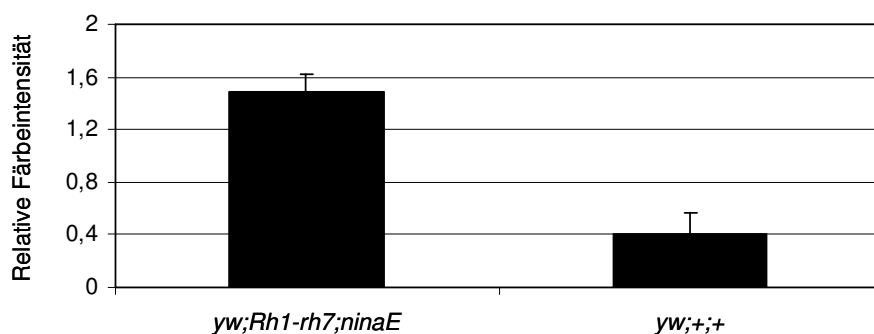
**Abb. 21: Antikörperfärbung (Rh7:E) an wholemount-Gehirnpräparaten (a-c) und Gefrierschnitten (d,e) von yw-Fliegen.**

(a) Starkes Antikörpersignal in den Ocellen der Taufliegen. (b) Vergrößerte Aufnahme der Ocellen. (c) Nur in etwa 20% der Gehirne wurden schwache Färbungen von je einer Zelle pro Hemisphäre, dorsal im posterioren Bereich des *pars intercerebralis* detektiert (siehe Pfeile). Die hellen Bereiche des rechten optischen Lobus treten durch unspezifische Hintergrundfärbung auf. (d) Längsschnitt der Ommatidien (Gefrierschnitt, 10µm). Schnitt ohne Inkubation mit primärem Antikörper (Rh7:E). Dies bestätigt, dass die Akkumulation des sekundären fluoreszenten Antikörpers in den Kristallkegeln der Ommatidien ein unspezifisches Signal ist. (e) Färbung eines Längsschnitts der Ommatidien (Gefrierschnitt, 10µm) mit Inkubation durch das Rh7:E-Serum und dem sekundären, fluoreszenten Antikörper. Der Rh7 Antikörper färbt die Rhabdomere der Ommatidien in der Retina.

### 3.2.1.2. Spezifizierung der Antikörperfärbung mit Hilfe der transgenen Linien und der RH7 Mutante

Nachdem der Antikörper in der Retina Signale gab, sollten die Rh1-Rh7-„Überexpressionslinien“ und die Rh7 knock-out Mutante als Kontrollstamm für die Spezifität des Signals eingesetzt werden. Zunächst wurden Kryostatschnitte von Wildtyp-Fliegen und Rh1-Rh7-„Überexpressionslinien“ gemacht und die Signalstärke in R1-6 bestimmt.

Als Referenzwert diente die Hintergrundfärbung in der Medulla. Die Antikörperfärbung mehrerer transgener „Überexpressionslinien“ wurden getestet. Generell konnte eine hoch signifikant höhere Signalstärke im Vergleich der Rh1-Rh7-„Überexpressionslinien“ zur Referenzlinie *yw;+;+* kalkuliert werden (ANOVA; Post Hoc Test  $p < 0,001$ ). Der höchste Färbeintensitätsunterschied bestand zwischen der Kontrolllinie und einer transgenen Linie (Linie 22), in der das *P-Element* auf dem zweiten Chromosom (*yw;Rh1-Rh7;+*) inseriert wurde (Abb. 22).

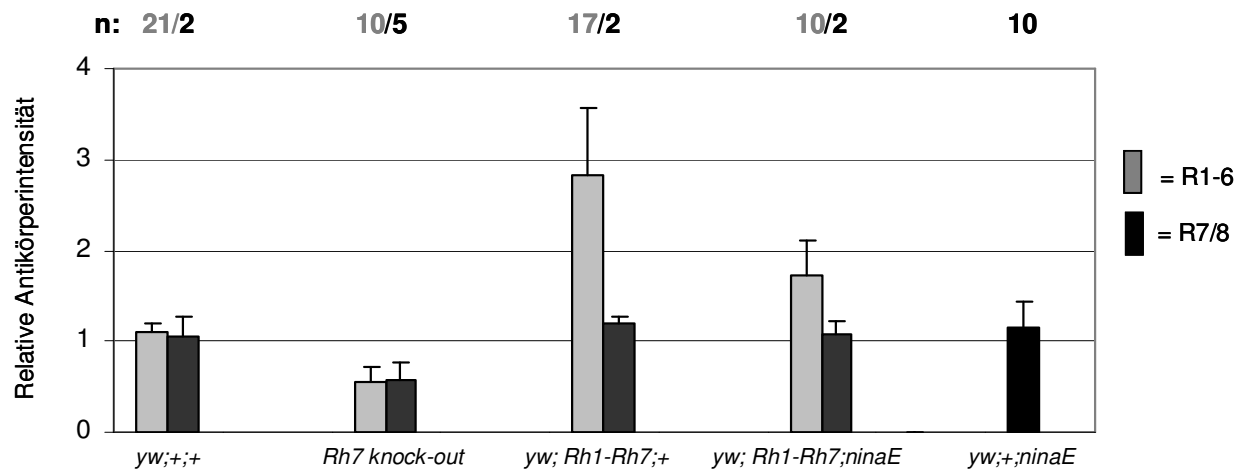


**Abb. 22: Signalstärke der Antikörperfärbung (Rh7:E):**

Vergleich der Intensität der Antikörperfärbung der am stärksten gefärbten Rh1-Rh7 Überexpressionslinie (Linie 22) mit der Referenzlinie *yw;+;+*. Je 10 Schnitte wurden gewertet. (ANOVA; Post Hoc Test  $p < 0,001$ ).

In einem weiteren Ansatz wurde die Signalstärke der Antikörperfärbung von Gefrierschnitten der Überexpressionslinie 22 und der Linie *yw;Rh1-Rh7;ninaE* mit der Färbung der knock-out Mutante und dem Wildtyp *yw;+;+* verglichen. Es wurde die Färbung in den R1-6 und in R7/8 bestimmt (Abb. 23). Allerdings war schwierig zwischen R1-6 und R7/8-Zellen unterscheiden zu können. Deshalb wurden nur solche Präparate gewertet, bei denen die Klassifizierung eindeutig war.

ANOVA ergab einen signifikanten Einfluss der verschiedenen Stämme auf die RH7-Antikörperfärbung in R1-6 ( $F_{3,54} = 39,915$ ;  $p < 0,01$ ) und R7/8 ( $F_{4,15} = 5,122$ ;  $p < 0,008$ ).



**Abb. 23: Signalstärke der Antikörperfärbung in R1-6 und R7-8 in Gefrierschnitten**

Graue Balken: Antikörpersignal in R1-6; schwarze Balken: Antikörpersignal in R7-8. n: Anzahl getesteter Schnitte in R1-6 (graue Zahlen) oder R7/8 (schwarze Zahlen).

Signifikante Unterschiede in der Färbeintensität der Antikörperfärbung in R1-6 sind zwischen dem Stamm *yw;+;+* und den Linien *yw;Rh1-Rh7;+* und *yw;Rh1-Rh7;ninaE*, detektierbar. Es wurde ein signifikant geringeres Signal in R1-6 und R7/8 in der *Rh7* knock-out Linie im Vergleich zur Kontrolllinie *yw;+;+* festgestellt ( $p < 0,05$ ).

Der anschließende Post Hoc-Test mit Bonferoni-Adaptation zeigte, dass die knock-out Mutante sowohl bei R7/8 als auch bei R1-6 ein signifikant geringeres Signal aufwies als die Kontrolle ( $p < 0,05$ ). Die Linien *yw;Rh1-Rh7;+* (Linie 22), der Linie *yw;Rh1-Rh7;ninaE* wiesen für R1-6 ein signifikant höheres Signal auf ( $p < 0,05$ ), bei R7/8 gab es keinen Unterschied (Abb. 23).

### 3.3. Funktionsanalyse des RH7 Proteins in der Taufliche

Nachdem RH7 tatsächlich zumindest in den Komplexaugen und den Ocellen der Fliegen exprimiert zu werden schien, sollte im Folgenden seine Funktion analysiert werden. Dabei waren die etablierten transgenen Linien und die knock-out Mutante von großem Vorteil.

#### 3.3.1. Rolle von RH7 als funktioneller Photorezeptor in der Taufliche

##### 3.3.1.1. „Rescue-Effekt“: Die *Rh1-Rh7*-Überexpression verhindert die Photorezeptordegeneration in der Linie *yw;Rh1-Rh7;ninaE*

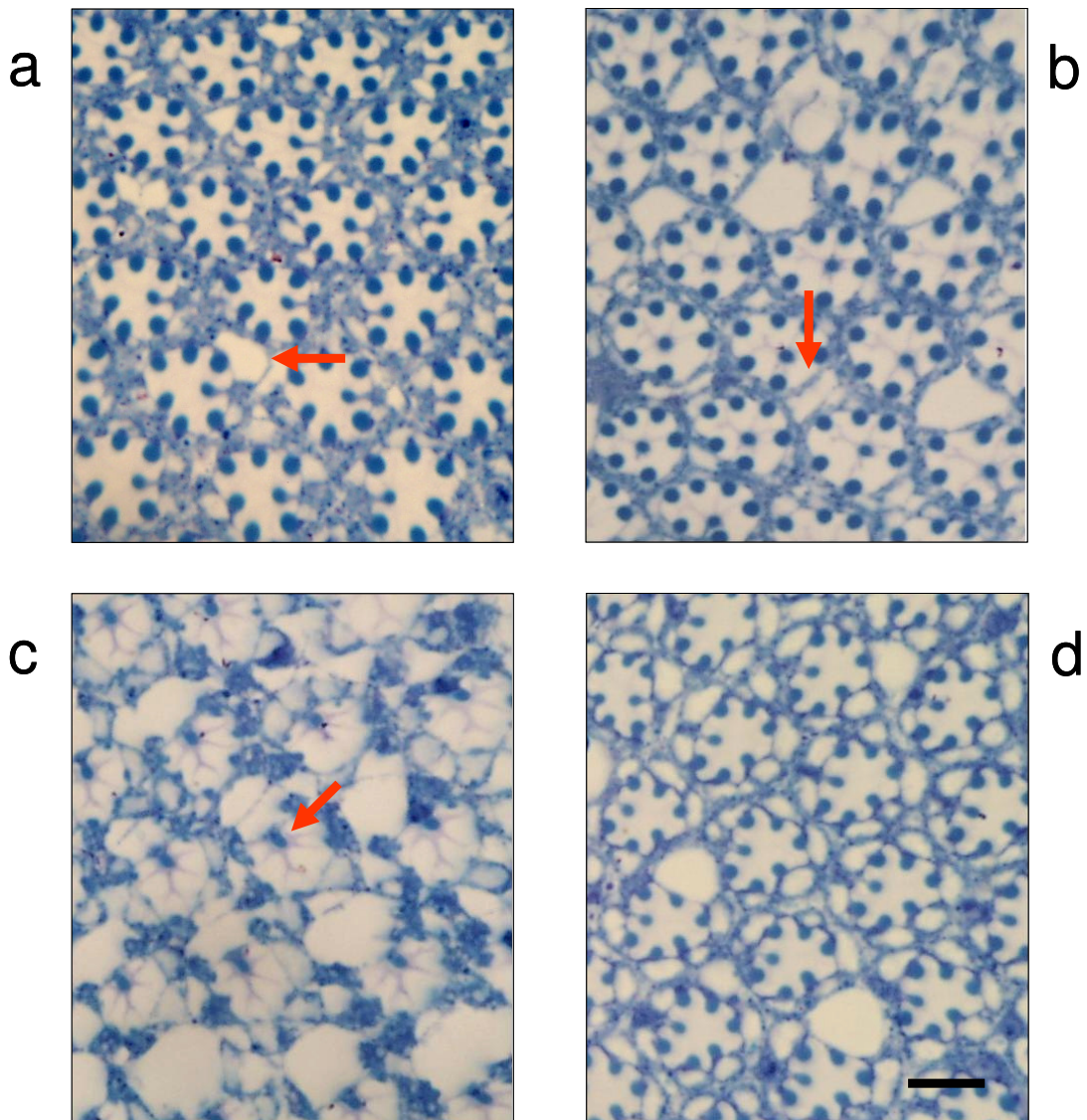
Zur Charakterisierung des histologischen Zustands der Rhabdomere in der Retina im Komplexauge wurden Semidünn-Tangentialschnitte der Retina von 25-28 Tage alten Wildtyp-Fliegen und Fliegen der Stämme *yw;Rh1-Rh7;+* (Linie 22), der Linie *yw;Rh1-Rh7;ninaE* und des



Stammes *yw;+;ninaE* angefertigt. Im Besonderen sollte überprüft werden, ob die Expression des Proteins RH7 anstelle von Rh1 die Degeneration der Photorezeptoren in R1-6 im *ninaE*-Hintergrund verhindern konnte. Die Werte wurden aus mindesten 8 Schnitten von vier verschiedenen Fliegen (mindestens 2 Schnitte/Fliege) pro Genotyp ermittelt.

Als entscheidendes Ergebnis lässt sich feststellen, dass die Rezeptorzellen R1-6 nicht nur beim Wildtyp und der Rh7-Überexpression eindeutig zu identifizieren sind, sondern diese auch bei der Überexpression im *ninaE*-Hintergrund ausgebildet wurden (Abb. 24). R1-6 fehlen in *yw;+;ninaE*, bedingt durch das Fehlen von Rh1. Nur die Rezeptorzellen R7/8 sind zu finden.

Nur ein sehr geringer Flächenanteil zwischen den Ommatidien (3,8%) der wildtypischen Fliegen ist durch Vakuolisierung degeneriert, es wurden auf einer als Referenz genormten Fläche 12 durch Vakuolisierung entstandene Löcher gezählt. Die Rhabdomere von R1-6 sowie von R7 und R8 sind vorhanden und gefärbt (Abb. 24a und Abb. 25).



**Abb. 24: 2µm-Tangentialschnitte von Retina-Semidünnpräparaten adulter *D.melanogaster*.**

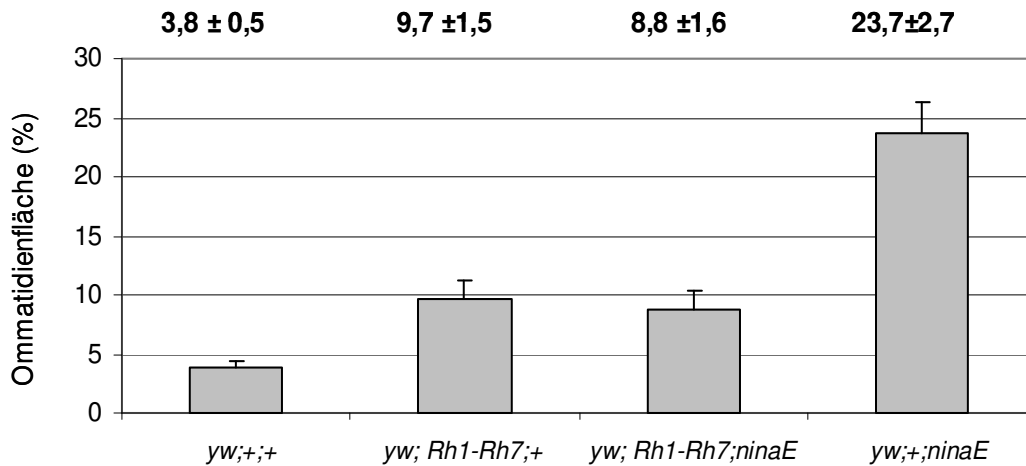
(a) Ausschnitt aus der Retina von *yw;+;+Fliegen*. In den quergeschnittenen Ommatidien sind die Rhabdomere von R1-6 sowie R7-oder R8 erkennbar. Ein sehr geringer Grad der Vakuolisierung ist erkennbar. Pfeil: Vakuole im Ommatidium, am linken Rand wurden die Pigmentzellen vom Ommatidium abgelöst. (b) Tangentialschnitt der Retina der Überexpressionslinie *yw;Rh1-Rh7;+* (Linie 22). Intakte Rhabdomere in den Ommatidien sind erkennbar. Mehrere Vakuolen zwischen den Ommatidien sind sichtbar. Pfeil: Vakuole zwischen Ommatidien, die Pigmentzellen wurden von den Ommatidien nicht abgelöst. (c) Photorezeptorfläche des Stammes *yw;+;ninaE*. Die Rhabdomere von R1-6 sind nicht vorhanden, ein hoher Grad der Vakuolisierung ist erkennbar. Pfeil: Querschnitt eines Ommatidiums in dem nur R7 oder R8 vorhanden ist. (d) Tangentialschnitt der Retina des Stammes *yw;Rh1-Rh7;ninaE*. „Rescue-Effekt“: Die Expression des *rh7*-Gens verhindert die Degeneration von R1-6 im *ninaE*-Hintergrund. Balken: 10µm

Der Phänotyp der Linie 22 mit der Rh1-Rh7 Überexpression ließ auf eine normale Entwicklung der Rezeptorzellen 1-6 sowie 7 und 8 schließen. In einem Flächenanteil von 9,7% wurde eine Vakuolisierung nachgewiesen, durchschnittlich 18 Löcher wurden pro genormten Flächenanteil registriert (Abb. 24 und Abb. 25). Im Stamm *yw;+;ninaE* wurde die Degeneration von R1-6 und der Verlust der Rhabdomere in R1-6 deutlich (Abb. 24). Die Rezeptorzellen 7 und 8 waren vorhanden und konnten in den Ommatidien nachgewiesen werden. Ein sehr hoher Anteil der Rezeptorfläche war degeneriert, eine Fläche von 23,7% war vakuolisiert. Durchschnittlich waren 38 durch Vakuolisierung entstandene Löcher pro genormten Flächenanteil vorhanden (Abb. 24 und Abb. 25). Der Phänotyp des Stammes *yw;Rh1-Rh7;ninaE* zeigte eine normale Entwicklung der Rezeptorzellen 1-6 sowie 7 und 8 auf. Eine Fläche von 8,8% entstand durch Vakuolisierung, durchschnittlich 26 durch Vakuolisierung entstandene Löcher pro genormten Flächenanteil waren auffindbar (Abb. 24 und Abb. 25).

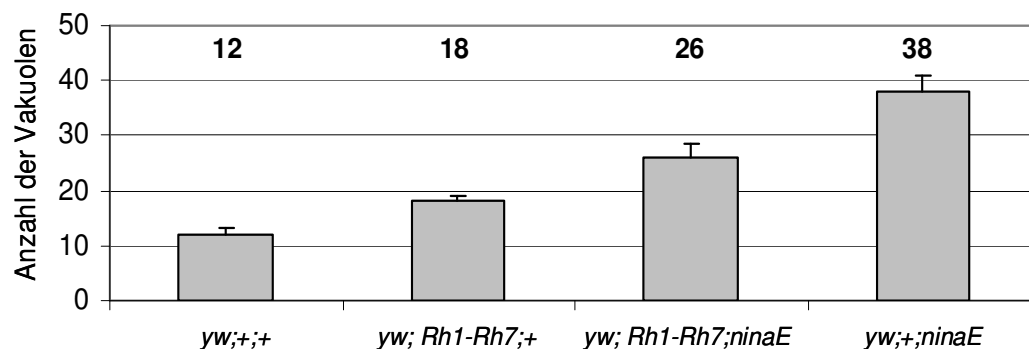
Es wurden hoch signifikante Unterschiede der durch Vakuolisierung entstandenen Fläche pro genormten retinalen Flächenanteil nur zwischen der Linie *yw;+;ninaE* und den anderen getesteten Stämmen ermittelt (Post Hoc Test;  $p = 0,000$ ). Die Berechnung des Verlustes der verbliebenen Photorezeptorfläche, gemessen an der Anzahl der Vakuolen pro genormten Flächenabschnitt der Referenzlinie *yw;+;+* war hoch signifikant unterschiedlich zu den Linien *yw;Rh1-Rh7;ninaE* und *yw;+; ninaE* (Post Hoc Test;  $p = 0,001$  bzw.  $p = 0,000$ ). Kein signifikanter Unterschied der Vakuolenanzahl war zur Linie *yw;Rh1-Rh7;+* registrierbar. Der Stamm *yw;Rh1-Rh7;ninaE* wies signifikant weniger Vakuolen auf als die Linie *yw;+;ninaE* (Post Hoc Test;  $p = 0,002$ ), aber signifikant mehr Vakuolen als die Linie *yw;Rh1-Rh7;+* (Post Hoc Test;  $p = 0,043$ ). Hoch signifikant mehr Vakuolen als in der Linie *yw;Rh1-Rh7;+* wurden im Stamm *yw;+; ninaE* nachgewiesen (Post Hoc Test;  $p = 0,000$ ).

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen auf, dass durch Expression des RH7 Proteins in R1-6 die Photorezeptordegeneration im *ninaE*-Hintergrund durch einen „Rescue“-Effekt verhindert wurde.

**a**



**b**



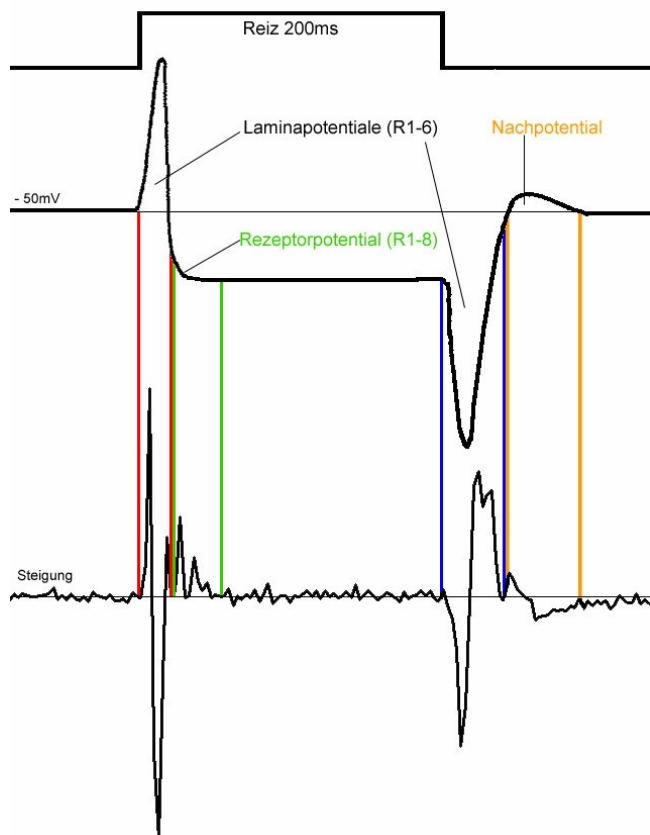
**Abb. 25: Quantifizierung der Vakuolisierung der Retina adulter Taufliegen**

(a) Berechnung der durch Vakuolisierung entstandenen Flächenanteile eines genormten Flächenabschnitts querschnittener Retina der Linien *yw;+;+*, *yw;Rh1-Rh7;+*, *yw;Rh1-Rh7;ninaE* und *yw;+; ninaE*. Der Stamm *yw;+;ninaE* weist eine hoch signifikant stärkere Vakuolisierung der Retina als die Vergleichsstämme auf (ANOVA;  $p < 0,000$ ). Zwischen den anderen Stämmen wurden keine signifikanten Unterschiede registriert. (b) Anzahl der Vakuolen pro genormten Flächenabschnitt. Hoch signifikant mehr Vakuolen als in der Referenzlinie *yw;+;+* konnten in den Linien *yw;Rh1-Rh7;ninaE* und *yw;+;ninaE* nachgewiesen werden, wobei kein signifikanter Unterschied zur Linie *yw;Rh1-Rh7;+* bestand. Der Stamm *yw;Rh1-Rh7;ninaE* hatte signifikant mehr Vakuolen als die Linie *yw;Rh1-Rh7;+* und signifikant weniger Vakuolen als die Linie *yw;+;ninaE*.



### 3.3.1.2 ERG-Studien stützen die Annahme zur Fähigkeit der Photorezeption von RH7 in *yw;Rh1-Rh7;ninaE*

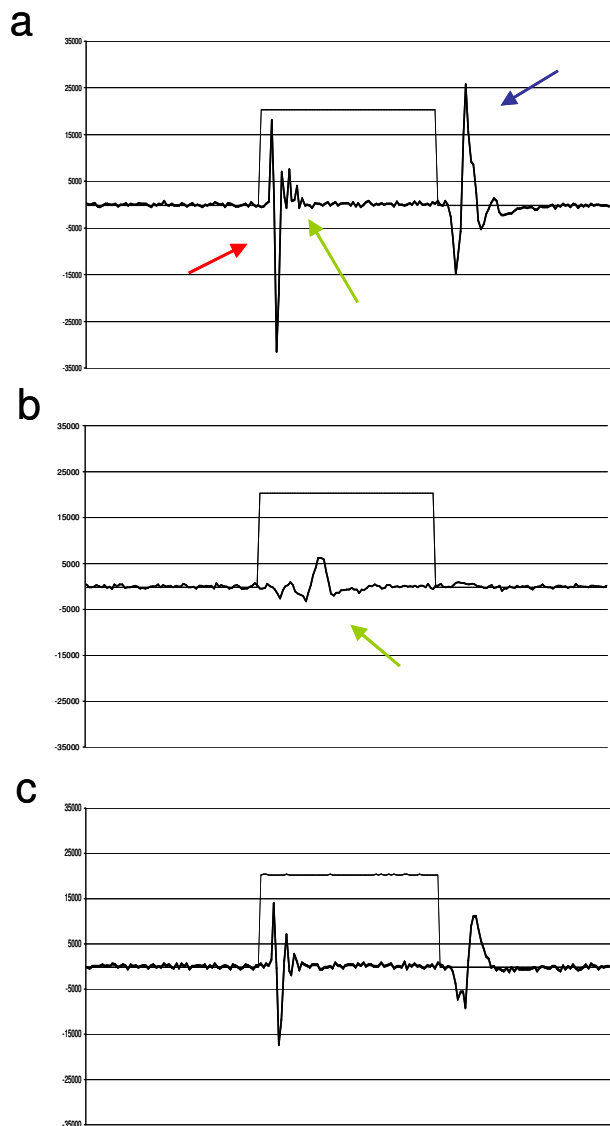
Die ERG-Studien wurden von Pia Gartmeier im Rahmen einer Zulassungsarbeit durchgeführt. Erklärend zum Verständnis der Abbildung 27 muß erwähnt werden, dass die erste Ableitung des Summenpotentials abgebildet wurde (siehe Abb. 26). Das Summenpotential wurde aus der Summe des Laminapentials der Rezeptorzellen R1-6 und dem Rezeptorpotential der in der Medulla verschaltenden Rezeptorzellen R7-8 berechnet.



**Abb. 26: Modell, das das Erstellen der ersten Ableitung aus einem ERG erklärt.**

Oben: Modell-ERG, unten: Modell einer ersten Ableitung aus einem Modell-ERG (Grafik nach P. Gartmeier).

Die erste Ableitung des ERG's der wildtypischen Fliegen *yw;+;+* weist nach Einsetzen des Reizes und nach Beendigung des Reizes eine deutliche *ON*- und *OFF-Response*, abgeleitet aus dem Laminapential auf (Abb. 27). Dies bestätigte die Funktionalität der Photorezeptoren nur in R1-6 (Heisenberg, 1971; Heisenberg und Wolf, 1984). In der Linie *yw;+;ninaE* war eine Ableitung des Laminapentials nicht erkennbar (Abb. 27). Dies lässt sich durch die Degeneration der Rezeptorzellen 1-6 erklären. Dadurch kann kein *ON*- und *OFF*-Signal mehr registriert werden. Lediglich das schwache Rezeptorpotential, das von R7-8 stammt, wurde nachgewiesen. (Abb. 27). Die erste Ableitung des ERG's der Fliegen *yw;Rh1-Rh7;ninaE* lässt eine deutliche *ON*- und *OFF-Response* erkennen (Abb. 27). Das bedeutet, dass das Protein RH7 die Rolle von Rh1 in der Linie *yw;Rh1-Rh7;ninaE* als funktioneller Photorezeptor übernehmen konnte.



**Abb. 27: ERG's der ersten Ableitung des Rezeptorpotentials von *D. melanogaster***

Dunkle Linie: Reiz; Dauer: 200ms. Alter der untersuchten Fliegen: 7-14 Tage.

(a) ERG der Linie *yw;+;+* Durch Stimulation mit dem Reiz konnte ein ON-Signal (roter Pfeil) und ein OFF-Signal (blauer Pfeil) registriert werden. Das Rezeptorpotential ist mit einem grünen Pfeil gekennzeichnet. (b) ERG der Linie *yw;+;ninaE*: bedingt durch die Degeneration von R1-6 konnte wie erwartet kein Laminapotentiale abgeleitet werden. Das Rezeptorpotential (grüner Pfeil), das sich aus den Potentialen von R7 und R8 zusammensetzt, ist erkennbar. (c) Das Protein RH7 generiert als funktioneller Photorezeptor in R1-6 in der Linie *yw;Rh1-Rh7;ninaE* ein normales ON- und OFF-Signal. Die Messungen wurden von Pia Gartmeier durchgeführt.

### 3.3.2. Analyse von Verhaltensexperimenten zur Charakterisierung der Rolle von RH7 in der circadianen Rhythmik

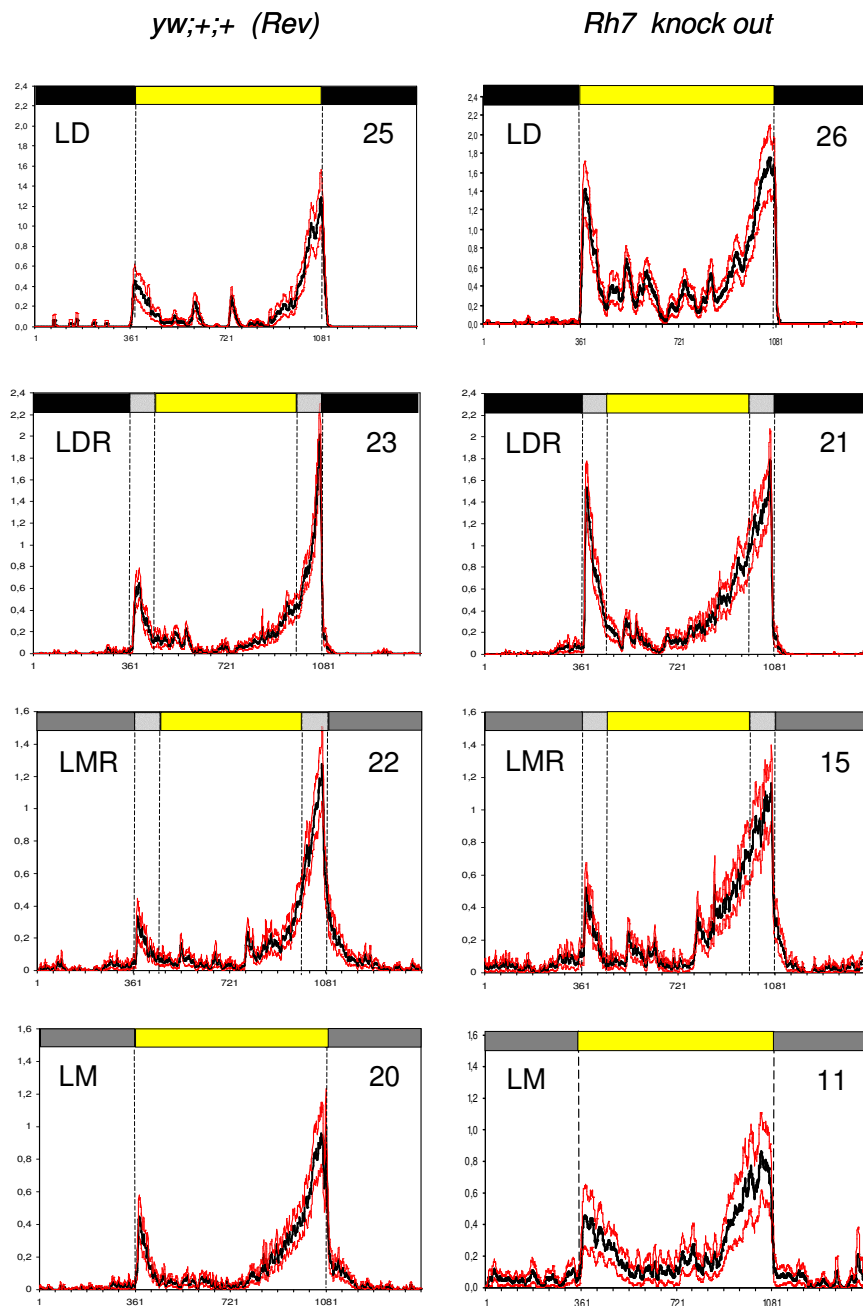
Die Etablierung der transgenen Überexpressionslinien und der Rh7 knock-out Mutante bot die Möglichkeit im Vergleich mit wildtypischen Fliegen die Funktion des RH7 Proteins in der circadianen Rhythmik analysieren zu können, da nicht nur die Ergebnisse der ERG-Studien auf die Fähigkeit der Photorezeption dieses Proteins hinwiesen. Wie die Expressionsanalysen erkennen lassen, könnte RH7 in den Komplexaugen exprimiert werden. Ein möglicher „Dämmerungs“-Photorezeptor, der auch in der Mondlichtsensorik (siehe erster Teil der Dissertation) eine Rolle spielen könnte, sollte auch in den Komplexaugen lokalisiert sein. Daher ist RH7 ein möglicher Kandidat für einen Schwachlichtrezeptor. Wie einleitend erwähnt, gibt es

darüberhinaus Hinweise dafür, dass es offensichtlich einen unbekannten Rotlichtrezeptor gibt, der für eine noch ungeklärte Rotlichtsensitivität des Wildtyps spricht (siehe Abb. 14).

Es wurden daher Verhaltensexperimente entworfen, die Aufschluss über eine mögliche Rolle von RH7 als Schwachlichtrezeptor oder möglichen Rotlichtrezeptor geben sollten. Die Rolle von RH7 als Kandidat für einen Schwachlichtrezeptor wurde in einem ersten Experimentansatz überprüft.

#### 3.3.2.1. Simulation der Dämmerung

Es wurde das Verhalten einer Revertante, die nachweislich RH7 exprimiert (siehe Abb. 19) mit dem Verhalten der Rh7 knock-out Mutante in diesem Experiment verglichen. Das Lichtprogramm bewerkstelligte die Simulation der Dämmerung durch Steuerung einer Lichtrampe, die eine logarithmische Zunahme (am Morgen) oder Abnahme (am Abend) der Weißlichtintensität über einen Zeitraum von 1,5 Stunden ermöglichte. Eine Woche wurde die Aktivität der Fliegen bei Dunkelheit in der Nacht und unter Verwendung der Dämmerungssimulation aufgezeichnet. In der darauf folgenden Woche wurden die Fliegen zusätzlichem schwachem Nachtlicht (Mondlicht von 0,03Lux) ausgesetzt. In der letzten Woche wurde das Verhalten der Fliegen in einem LM-Zyklus ohne Rampe aufgezeichnet. Vorab wurden die Fliegen in einem LD (12:12; Lichtintensität 100Lux) 6 Tage lang synchronisiert. Aus den Aktivitätsprofilen der Einzelfliegen wurden die Durchschnittstage aller Fliegen für jeden Lichtzyklus berechnet. Es zeigte sich, dass die wildtypischen Fliegen und die knock-out Mutanten generell in allen gewählten Lichtprogrammen ein bimodales Aktivitätsmuster aufwiesen (Abb. 28).



**Abb. 28: Durchschnittstage der wildtypischen Fliegen der Linie 13 und der Rh7 knock-out Mutante im „Dämmerungsexperiment“**

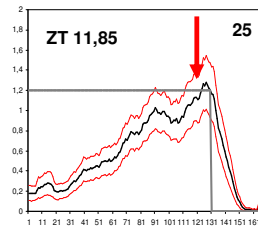
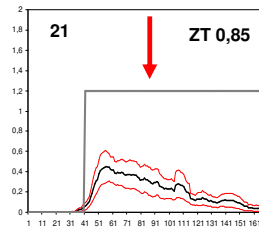
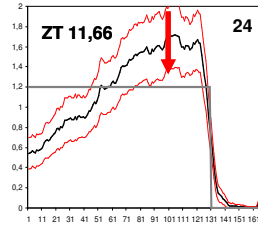
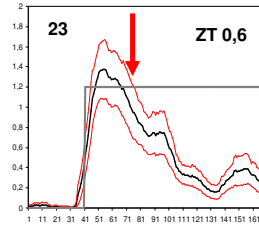
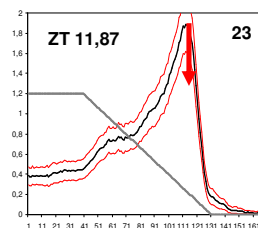
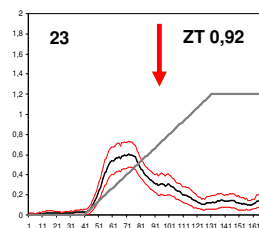
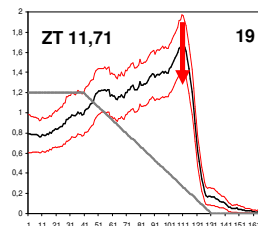
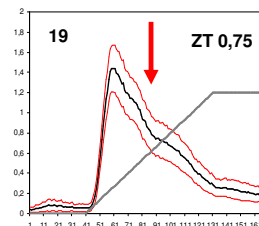
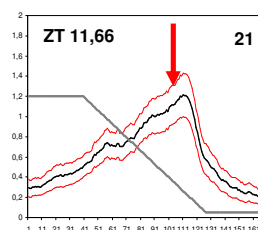
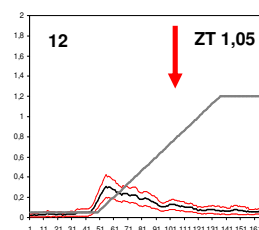
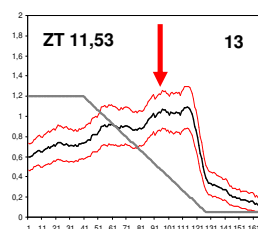
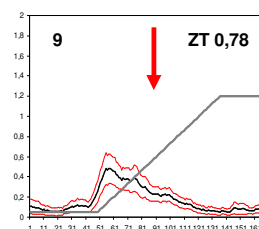
Linke Seite: Durchschnittstage der Revertante (Linie13), rechte Seite: knock-out Mutante.

Die Zahlen geben die Anzahl getesteter Fliegen wieder. Die farblich markierten Balken geben das Lichtprogramm wieder. Gelb: Tageslicht; helles Grau: Mondlicht, dunkles Grau: Lage der Rampe (Dämmerungssimulation). Der Vergleich der Durchschnittstage im LD weist auf eine erhöhte Morgenaktivität der knock-out Mutante im Vergleich zur Revertante hin. Der erhöhte Aktivitätsspiegel im Morgenpeak kann auch unter Rampenbedingungen nachvollzogen werden. Unter LMR-Zyklen sind beide Stämme in der Mondnacht etwas aktiver als in der völlig dunklen Nacht. Dies trifft für beide Stämme zu. Im LM-Zyklus können im Aktivitätsprofil der beiden Fliegenstämme in den Durchschnittstagen keine gravierenden Unterschiede festgestellt werden. Die roten Linien im Aktogramm stellen den Standardfehler (SEM) dar.

Beim Vergleich der Aktivitätsprofile im LD konnte festgestellt werden, dass der Morgenpeak der knock-out Mutante durch einen verstärkten „Licht-an“-Peak eine größere Amplitude als der Morgenpeak der Revertante aufwies. Generell waren die Rh7 knock-out Fliegen etwas aktiver als die Revertanten. Im folgenden Lichtzyklus wurde die Dämmerung mit Hilfe der Rampe simuliert. Ein stärkerer Licht-an Effekt ist nach wie vor in der knock-out Mutante erkennbar, des Weiteren waren aber keine deutlichen Unterschiede im Verhaltensmuster der beiden Linien nachvollziehbar. Durch zusätzliche Erhellung der Nacht durch Simulation von Mondlicht konnte in beiden Linien ein geringer Anstieg von Aktivität in der Nacht verzeichnet werden. Es war im LMR-Lichtprogramm nur noch ein leicht verstärkter Aktivitätsanstieg im Morgenpeak der knock-out Fliegen im Vergleich zu den Revertanten erkennbar. Im letzten Lichtzyklus, LM, waren die Fliegen relativ alt und nur eine geringe Zahl von Fliegen überdauerte die letzte Aufzeichnungsphase. Deutlich Unterschiede im Aktivitätsprofil der Fliegenstämme waren nicht erkennbar.

Durch den Einsatz der Rampe zur Simulation der Dämmerung wurde die exakte Bestimmung der Lage des Morgenpeaks und des Abendpeaks ermöglicht, um eine eventuelle Rolle von RH7– im Vergleich der Revertante mit der Rh7 knock-out Linie– als Schwachlichtrezeptor charakterisieren zu können.

Um eine detaillierte Darstellung der Morgen- und Abendaktivität zu ermöglichen, wurden Detailausschnitte aus Durchschnittstagen aller verwendeter Aktogramme der Fliegen angefertigt. Diese Aufzeichnung beschränkte sich auf 150 Minuten, beginnend 40 Minuten vor Licht-an oder vor Beginn der Dämmerungssimulation (Rampe). Auf die Darstellung der LM-Daten wurde verzichtet (Abb. 29).

**LD***yw;+;+ (Rev)**Rh7- knock out***LDR***yw;+;+ (Rev)**Rh7- knock out***LMR***yw;+;+ (Rev)**Rh7- knock out***Abb. 29: Genaue Bestimmung der Lage der Aktivitätspeaks im „Rampenexperiment“**

Die Abbildung ist in drei getrennte Bereiche, entsprechend den Lichtprogrammen LD, LDR und LMR, gegliedert. In der linken Reihe sind die Aktogrammausschnitte der Durchschnittstage der Morgenaktivitäten, in der rechten Reihe die Aktogramme der Abendaktivitäten abgebildet. Die Zahlen am unteren Rand der Aktogramme sind Minutenwerte. Die Zeitgeberzeiten (ZT) der exakt berechneten Lage der Morgen- und Abendpeakmaxima sind in den Aktogrammen ebenso wie die Anzahl verwendeter Fliegen angegeben. Die roten Pfeile verweisen auf die berechnete Lage der Morgen- und Abendpeakmaxima. Durchgehende, graue Linie: Symbolisierung des Verlaufs der Lichtintensität der Lichtrampe. Die roten Linien im Aktogramm stellen den Standardfehler (SEM) dar.

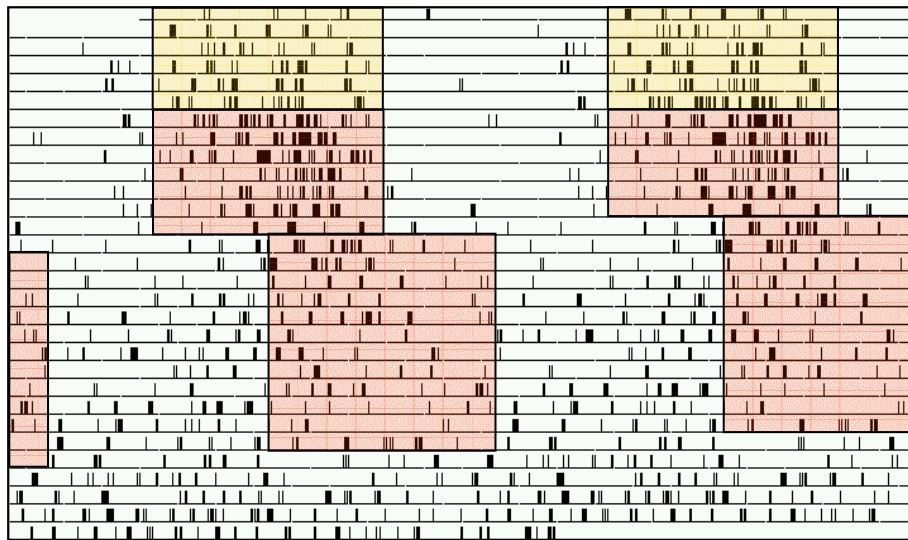
Die Pfeile in den Aktogrammausschnitten spiegeln die Lage der berechneten Morgen- und Abendpeaks wieder. Diese divergierten von den Licht-an bzw. Licht-aus-Peaks, einer direkten Reaktion auf den abrupten Lichtwechsel, die in den Aktogrammausschnitten als deutliche Aktivitätspeaks hervortreten.

Im LD konnte jeweils ein früherer Beginn des Morgen- und des Abendpeaks der knock-out Mutante im Vergleich zur Revertante festgestellt werden. Der Morgenpeak der knock-out Mutante lag bei ZT 0,6, der Peak der Revertante bei ZT 0,85. Der Abendpeak lag bei der Revertante bei ZT 11,85, der Abendpeak der knock-out Mutante bei ZT 11,66 (Abb. 29). Eine genauere Analyse der Lichtsensitivität und damit der Lage des Morgen- bzw. Abendpeaks wurde in der folgenden Aufzeichnungswoche durch Einsatz der Rampe ermöglicht. Es konnte nachgewiesen werden, dass auch im LDR die im LD beobachtete, verfrühte Lage der Aktivitätspeaks der knock-out Mutante im Vergleich zur Revertante nachvollziehbar war. So wurde die Lage des Morgenpeaks bei ZT 0,75, die des Abendpeaks bei ZT 11,71 für die knock-out Mutante berechnet. Die Kalkulation der Lage des Morgenpeaks der Revertante lag bei ZT 0,92, die Lage des Abendpeaks war bei ZT 11,87 (Abb. 29). Der Wechsel des Lichtprogramms durch zusätzliche Erhellung der Nacht durch schwaches Mondlicht in Verbindung mit der Dämmerungssimulation bestätigte wiederum die in LD und LDR beobachtete Tendenz, dass die Lage der Aktivitätspeaks der knock-out Mutante früher zu verzeichnen war, als die Lage der Peaks der Revertante. Im LMR wurde das Aktivitätsmaximum der knock-out Mutante am Morgen für ZT 0,78, am Abend für ZT 11,53 errechnet. Der Morgenpeak der Revertante war bei ZT 1,05, der Abendpeak bei ZT 11,66 (Abb. 29). Ein Vergleich der Lage der Aktivitätspeaks in LDR und LMR der beiden Stämme zeigte auf, dass durch die Veränderung des Lichtprogramms eine Verbreiterung der Phasenbeziehungen der Aktivitätspeaks entstand. Die Analyse der Lage der Morgenpeaks der Fliegenlinien in LDR und LMR wies auf Unterschiede der Reaktionen der Stämme auf die unterschiedlichen Lichtprogramme hin. Es konnten signifikante Unterschiede in der Lage der Morgenpeaks der Stämme in LDR und LMR kalkuliert werden (ANOVA:  $p = 0,002$ ). Die Lage der Abendpeaks der beiden Stämme in LDR und LMR war hoch signifikant verschieden (ANOVA:  $p = 0,000$ ). Die beiden Stämme reagierten aber ähnlich auf die Lichtveränderung mit einer Verfrühung der Abendpeaks.

### 3.3.2.2. Rotlicht-Shiftexperiment zum Test des Resynchronisationsverhaltens

In diesem Experimentansatz wurde durch Vergleich der transgenen Linien, der Revertante, dem Wildtyp *yw;+;+;* der Rh1 Mutante *yw;+;ninaE* und der Rh7 knock-out Mutante eine mögliche Rolle von RH7 in der Rotlichtdetektion analysiert. Es wurde getestet, wie lang die Fliegen der verschiedenen Stämme brauchen, um auf eine 6-Stunden-Verschiebung des RD-Zyklus zu

resynchronisieren. Zum Testen der Dosisabhängigkeit des Resynchronisationsvermögens wurden Experimente mit Rotlichtintensitäten von  $0,02\mu\text{W}/\text{cm}^2$ ,  $0,04\mu\text{W}/\text{cm}^2$  und  $0,08\mu\text{W}/\text{cm}^2$  benutzt. Beim ersten Experiment (mit  $0,02\mu\text{W}/\text{cm}^2$ ) wurden die Fliegen zunächst durch einen LD-Zyklus synchronisiert, bei allen folgenden Experimenten wurde direkt mit dem RD-Zyklus begonnen. *Yw;+;ninaE*-Fliegen konnten nur im LD-Zyklus synchronisiert werden, jedoch in keinem der RD-Zyklen (Abb. 30). Die anderen Stämme waren zu unterschiedlichen Prozentsätzen in der Lage zu synchronisieren bzw. resynchronisieren. Im Folgenden sollen die Aktivitätsprofile der verschiedenen Stämme in RD-Zyklen genauer betrachtet werden. Die Aktivitätsprofile wurden nur von synchronisierten Tieren berechnet. *Yw;+;ninaE*-Mutanten waren hier ausgenommen, da sie Freilauf zeigten und nicht synchronisiert wurden.



**Abb. 30: Aktogramm einer *yw;+;ninaE*-Fliege**

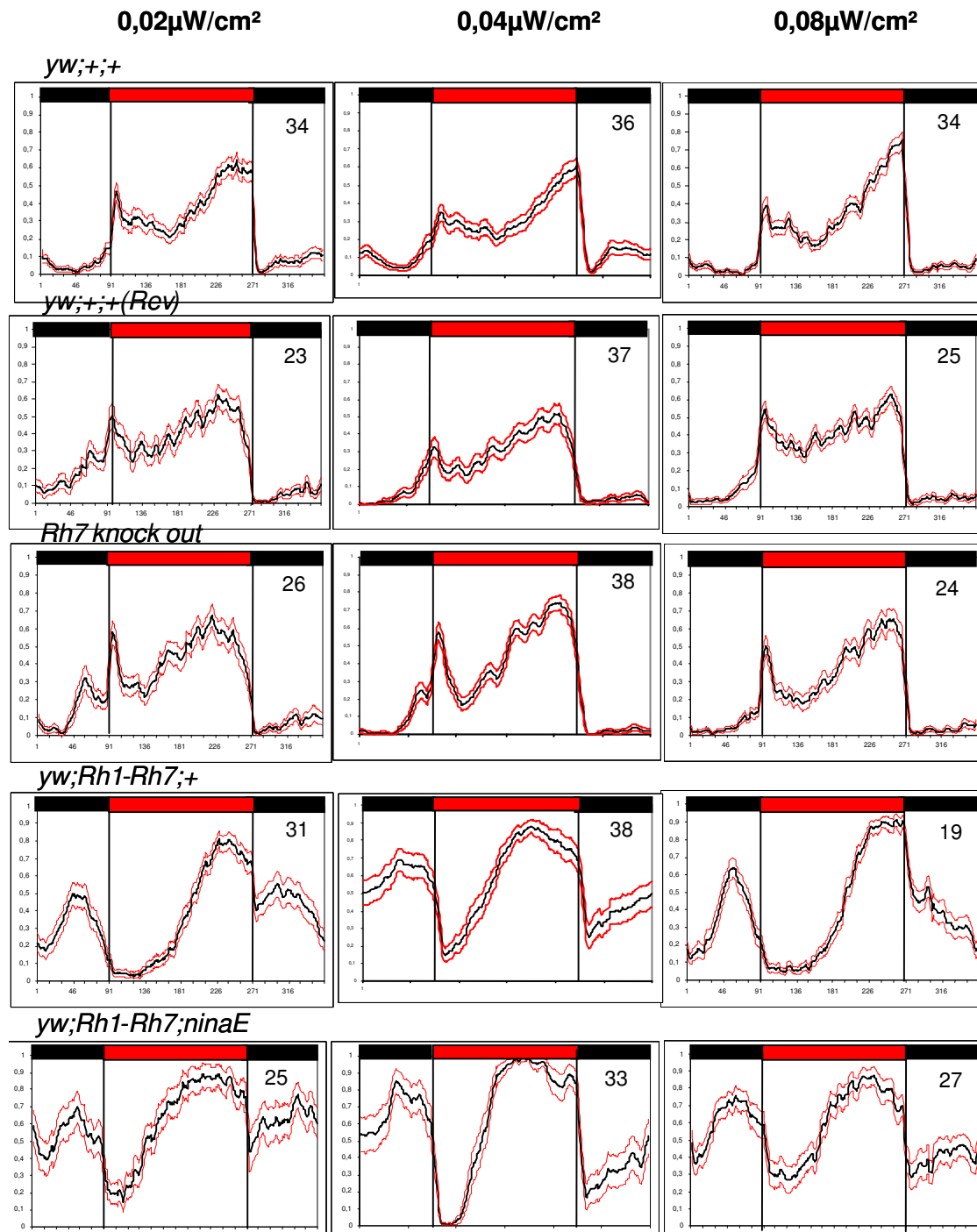
Die Fliegen konnten von Tag 1-6 in LD (gelb hinterlegte Bereiche im Aktogramm) synchronisiert werden. Ab Tag 7-14 waren die Fliegen im Freilauf mit einer Periodenlänge ( $\tau$ ) von  $\sim 24\text{h}$ . Es konnte keine Synchronisation der Tiere auf RD-Zyklen festgestellt werden. Die Fliegen folgten dem RD-Shift nicht und wurden arrhythmisch.

Die Kontrolllinien zeigten bei allen Rotlichtintensitäten ein bimodales Aktivitätsmuster mit einem schwachen Morgenpeak und deutlicherem Abendpeak und dazwischen eine schwach ausgeprägte Mittagsruhe. Eine geringe Nachtaktivität war zu sehen, die nicht von der Rotlichtintensität abhing. Der schwache Morgenpeak lag innerhalb des Licht-an Peaks, die Abendaktivität wurde nach Licht-aus gehemmt (Licht-aus-Effekt) (Abb. 31). Die Revertante (Linie13) zeigte ein ähnliches Aktivitätsmuster wie die Fliegen des Wildtypstamms *yw;+;+*, wobei ein etwas verfrühter Abendpeak bei der Revertante zu verzeichnen war. Ein Unterschied bestand darin, dass die Fliegen der Revertante im RD der Intensität  $0,02\mu\text{W}/\text{cm}^2$  in der zweiten Nachthälfte eine höhere Nachtaktivität als die *yw;+;+*-Fliegen aufwiesen (Abb. 31). Eine Rotlichtdosis-abhängige



Verringerung der Phasenbeziehung zwischen Morgen- und Abendpeak wurde in der *Rh7* knock-out Linie festgestellt. Der Morgenpeak war bei einer Rotlichtintensität von  $0,02\mu\text{W}/\text{cm}^2$  deutlich vor dem Licht-an Peak, näherte sich dem Licht-an peak bei  $0,04\mu\text{W}/\text{cm}^2$  an und verschmolz mit dem Licht-an Peak bei  $0,08\mu\text{W}/\text{cm}^2$ . Ausserdem war in dieser Linie die Mittagsruhe deutlicher ausgeprägt als in der Revertante bzw. *yw;+;+*-Linie (Abb. 31). Das Aktivitätsprofil der *yw;Rh1-Rh7;+*-Fliegen zeichnete sich durch eine hohe Grundaktivität der Fliegen aus. Ein sehr früher, deutlicher Morgenpeak war in der Nacht zu sehen. Diese Morgenaktivität wurde durch den Licht an-Effekt unterdrückt, ein starker Abfall der Aktivität, divergierend vom Verhalten der Revertante bzw. *yw;+;+*-Linie konnte nachgewiesen werden. Kaum Aktivität war am „Vormittag“ (verfrühte Mittagspause) zu registrieren. Der durch hohe Aktivität ausgezeichnete Abendpeak wurde durch den Licht-aus Effekt bei Beginn der Nacht abrupt unterbrochen. Ein hoher Aktivitätsspiegel in der Nacht war unabhängig von der Rotlichtintensität nachweisbar (Abb. 31).

Das Grundmuster der Durchschnittstage der *yw;Rh1-Rh7;ninaE*-Fliegen war kaum unterschiedlich zum Aktivitätsmuster der *yw;Rh1-Rh7;+*-Fliegen (Abb. 31).

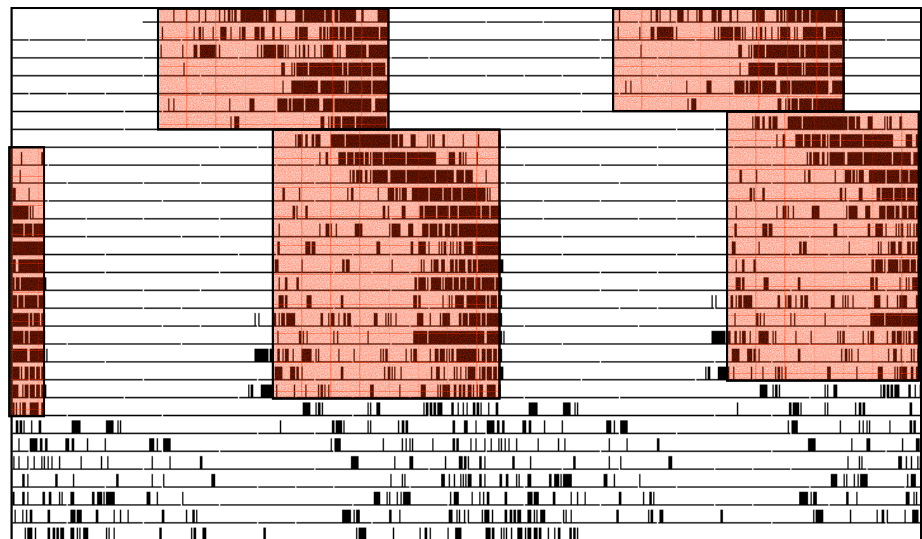


**Abb. 31: RD-Durchschnittstage der getesteten transgenen Linien, Wildtyp-Stämme und der knock-out Mutante**

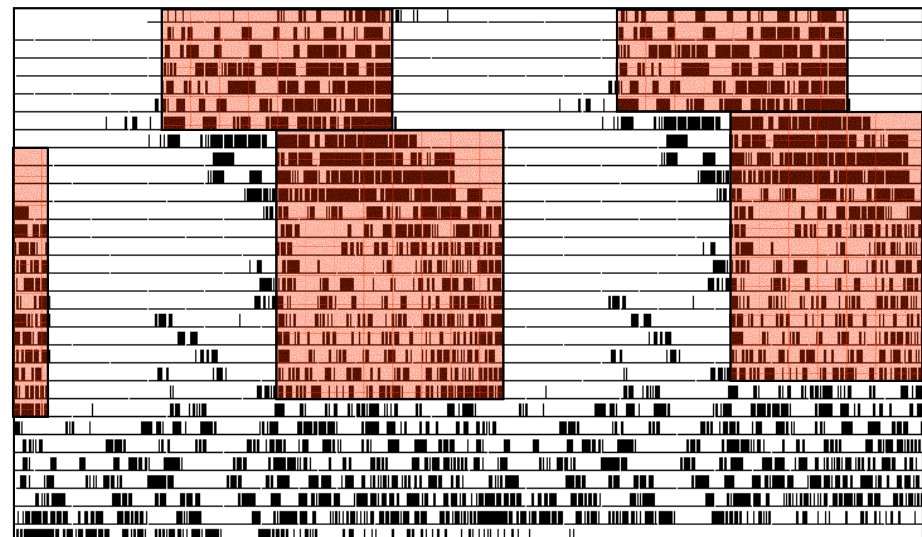
Vertikal sind in drei Reihen die Durchschnittstage (mit Angabe der Anzahl der getesteten Fliegen) aus Experimenten mit den Rotlichtintensitäten von 0,02 $\mu$ W/cm<sup>2</sup>, 0,04 $\mu$ W/cm<sup>2</sup> und 0,08 $\mu$ W/cm<sup>2</sup> angeordnet. Die Balken im Aktogramm symbolisieren das Lichtprogramm. Der Wildtyp *yw;+;+* und die Revertante zeigen ein bimodales Aktivitätsmuster mit geringer Nachtaktivität. Die *Rh7* knock-out Mutante hat bei 0,02 $\mu$ W/cm<sup>2</sup> und 0,04 $\mu$ W/cm<sup>2</sup> einen verfrühten Morgenpeak und eine verfrühte Mittagspause. Die *Rh1-Rh7*-Überexpression im Wildtyp- und im *ninaE*-Hintergrund hat einen stark verfrühten Morgenpeak und eine verfrühte Mittagspause, sowie eine erhöhte Nachtaktivität. Die roten Linien im Aktogramm stellen den Standardfehler (SEM) dar.

Nach dem Synchronisieren der Fliegen in RD für 7 Tage wurde der RD-Zyklus durch ein verspätetes Einschalten des Rotlichtes um 6 Stunden geshiftet. Das Resynchronisationsvermögen des Morgen- und Abendpeaks der Fliegen wurde ermittelt. Die Fliegen wurden für 15 Tage in der neuen LD-Phase registriert. Anschliessend wurden die Tiere für 9 Tage im DD gehalten, um die Kalkulation der Freilaufperiode zu ermöglichen. Die durchschnittliche Shiftdauer innerhalb eines Zeitraums von 15 Tagen wurde durch unabhängiges Schätzen von mindestens drei Mitarbeitern der Arbeitsgruppe bewertet. Die Experimente mit Rotlichtintensitäten von  $0,02\mu\text{W}/\text{cm}^2$ ,  $0,04\mu\text{W}/\text{cm}^2$  und  $0,08\mu\text{W}/\text{cm}^2$  wurden zum Testen der Dosisabhängigkeit des Resynchronisationsvermögens durchgeführt.

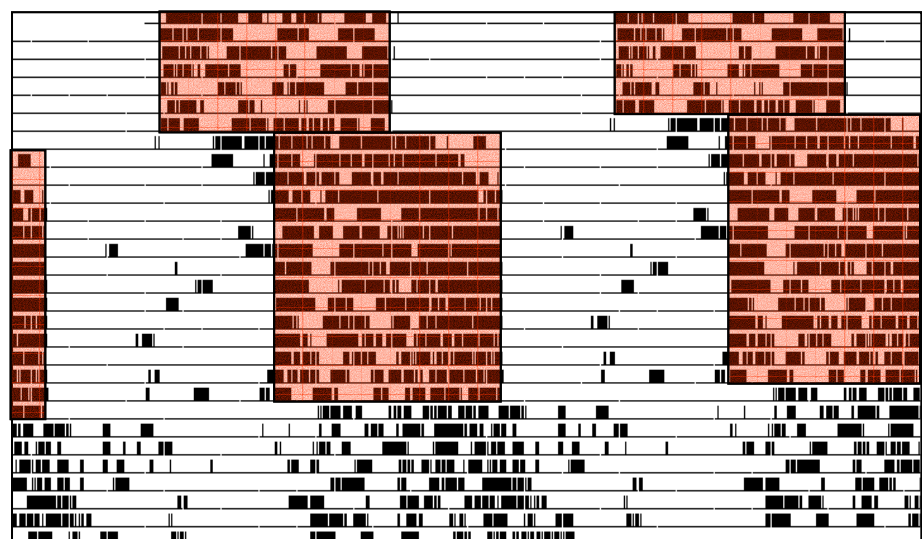
Repräsentative Aktogramme der verschiedenen Stämme bei  $0,08\mu\text{W}/\text{cm}^2$  sind in Abb. 32 gezeigt.

$yw;+;+$ 

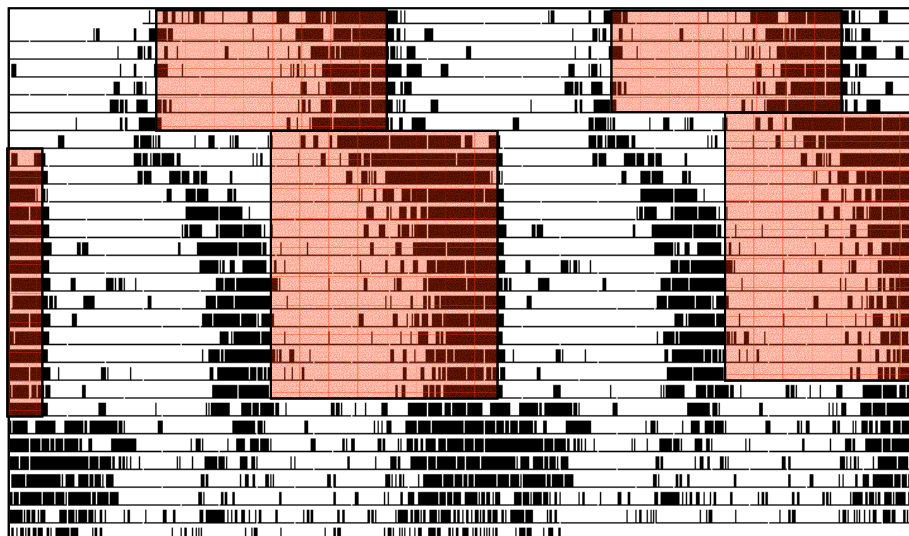
*yw;+;+ (Rev)*



### *Rh7 knock out*



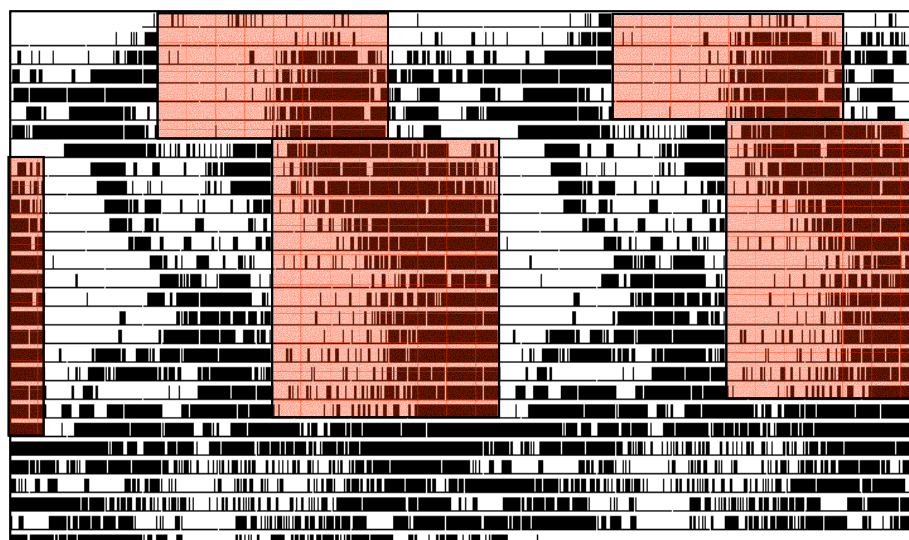
*yw;Rh1-Rh7;+*



1

*yw;Rh1-Rh7;ninaE*

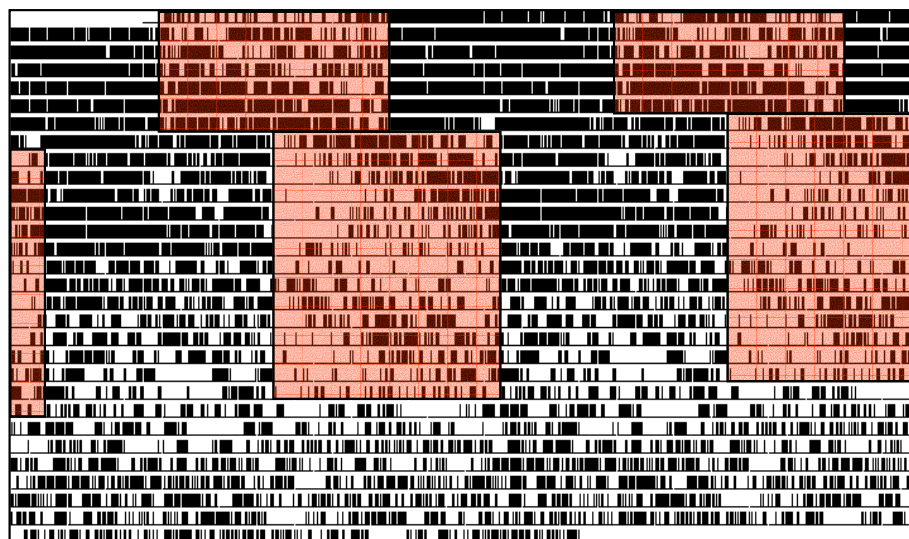
Synchronisation  
zu RD;  
Resynchronisation  
< 15 Tage



2

*yw;Rh1-Rh7;ninaE*

Keine  
Synchronisation  
zu RD

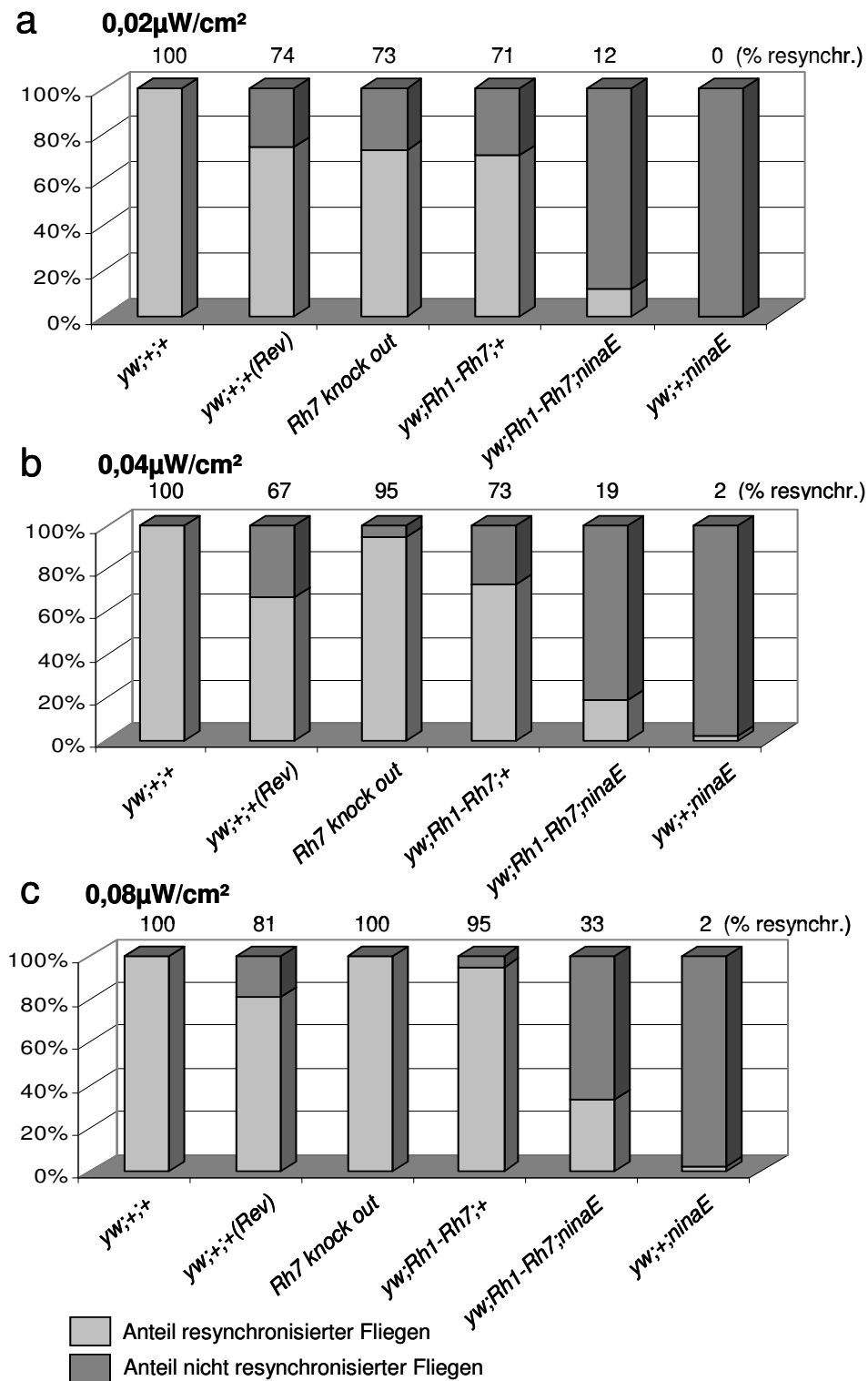


**Abb. 32: Einzelaktogramme der getesteten transgenen Linien, Wildtyp-Stämme und der Rh7 knock-out Mutante im RD Shiftexperiment bei  $0,08\mu\text{W}/\text{cm}^2$  Rotlicht**

Die mit roter Farbe hinterlegten Bildbereiche geben das Lichtprogramm wieder: Tag 1-7: RD  $0,08\mu\text{W}/\text{cm}^2$ , Tag 8: Verspäteter Beginn des RD um 6h, (Shift) Tag 8-23 RD, Tag 23-Ende DD.

Die Wildtypfliegen *yw;+;+* resynchronisierten innerhalb weniger Tage nach dem Shift. Der Stamm *yw;+;+* (Revertante) zeigte ebenso wie die Rh7 knock-out Mutante ein stabiles Resynchronisationsvermögen. Die Linie *yw;Rh1-Rh7;+* konnte zum Großteil ihren Rhythmus mit dem RD nach dem Shift innerhalb von 15 Tagen resynchronisieren. Bei  $0,08\mu\text{W}/\text{cm}^2$  Rotlichtintensität konnten 33% der *yw;Rh1-Rh7;ninaE*-Fliegen zum verschobenen RD innerhalb 15 Tagen resynchronisiert werden. Ein Anteil von etwa 22% der *yw;Rh1-Rh7;ninaE*-Fliegen konnte zum RD in der ersten Woche der Aufzeichnung nicht synchronisiert werden.

Die Fliegen des Wildtypstammes *yw;+;+* konnten ausnahmslos sowohl die Morgen- als auch die Abendaktivität unabhängig von der Rotlichtintensität dem geshifteten RD-Zyklus anpassen (100% Resynchronisation) (Abb. 33). Die durchschnittliche Dauer die zu einer stabilen Anpassung an den geshifteten RD-Zyklus benötigt wurde, betrug 7,5 Tage für Morgen- und Abendpeak bei  $0,02\mu\text{W}/\text{cm}^2$  Rotlicht. Eine Erhöhung der Rotlichtintensität resultierte in einer dosisabhängigen Verkürzung der zur Resynchronisation benötigten Zeit auf 4,5 Tage (Abb. 34). Das Lichtprogramm war für 7 Tage RD, am Tag 8 wurde der Shift vollzogen. Die folgenden 15 Tage wurden die Fliegen im RD der neuen Periode gehalten. Abschließend wurden die Tiere für 9 Tage im DD gehalten, um die Kalkulation der Freilaufperiode zu ermöglichen (Abb. 32). Die in diesem Abschnitt beschriebene Resynchronisation der *yw;+;+*-Fliege zu dem veränderten RD innerhalb nur weniger Tage ist deutlich erkennbar.



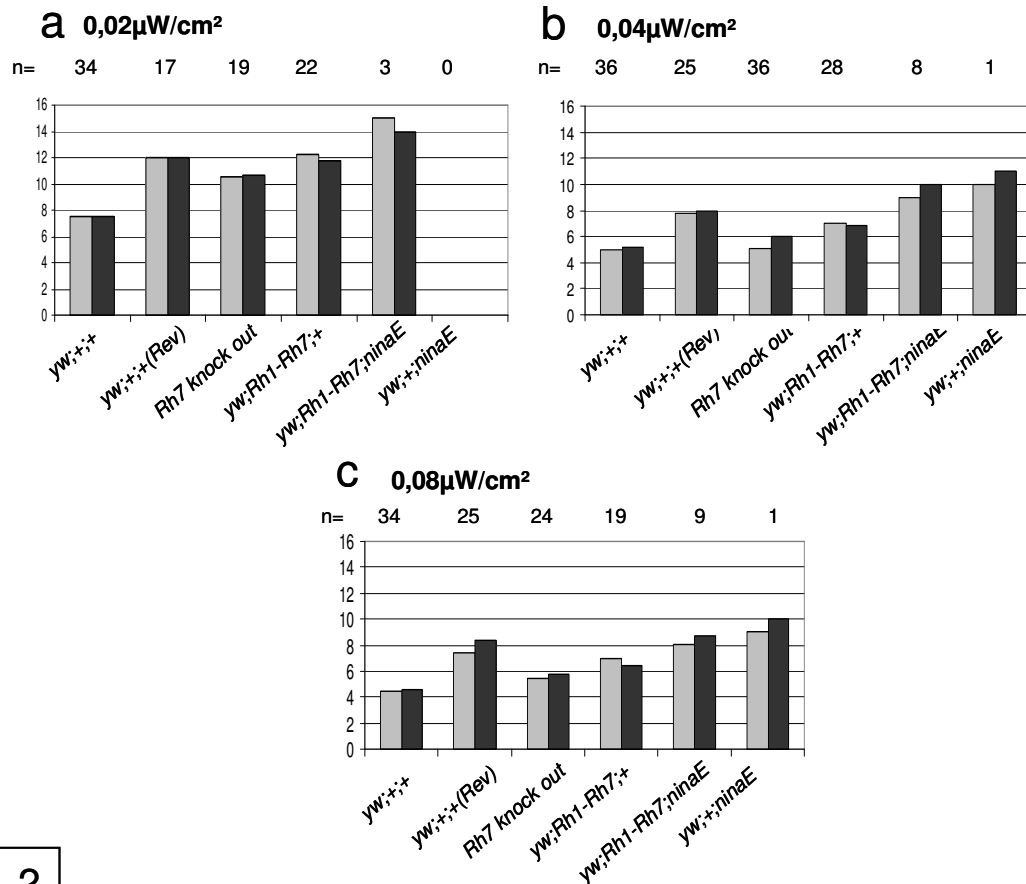
**Abb. 33: Anteil der Fliegen eines Stammes, die in einer Zeit von bis zu 15 Tagen nach dem Shift ihre Aktivität mit dem RD resynchronisieren konnten.**

Prozentuale Angabe des Resynchronisationsvermögens der Fliegen zu einem um 6h verspäteten RD-Zyklus bei Rotlichtintensitäten von (a)  $0,02\mu\text{W}/\text{cm}^2$ , (b)  $0,04\mu\text{W}/\text{cm}^2$  und (c)  $0,08\mu\text{W}/\text{cm}^2$ . Das Resynchronisationsvermögen der Rh7 knock-out Mutante war mit dem Wildtyp vergleichbar.

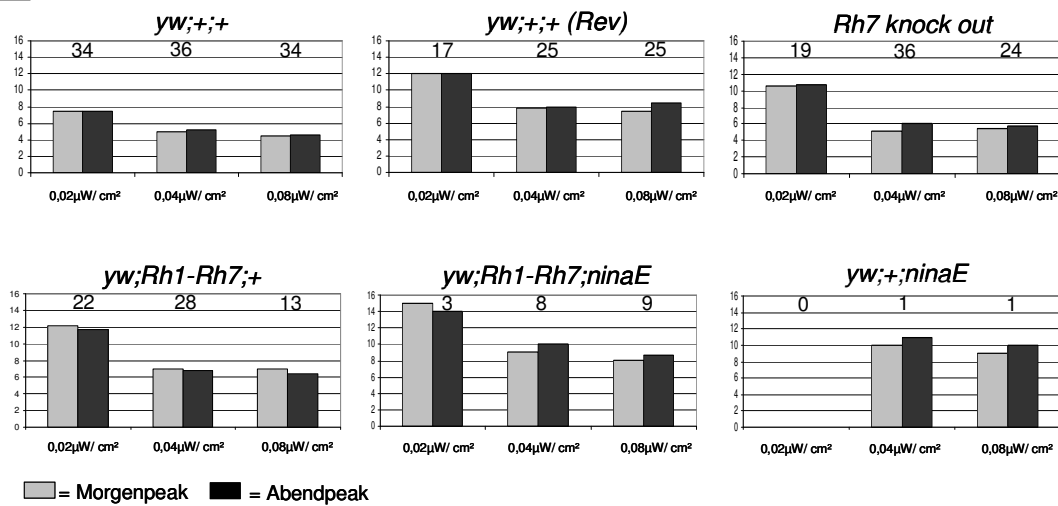
Das Resynchronisationsvermögen der Revertante und beim Wildtyp war nicht abhängig von der Dosis der Lichtintensität. So konnten bei der Revertante bei einer Rotlichtintensität von  $0,02\mu\text{W}/\text{cm}^2$  74% der Fliegen resynchronisiert werden, bei einer Beleuchtungsintensität von  $0,04\mu\text{W}/\text{cm}^2$  nur 67%. Bei einer Intensität von  $0,08\mu\text{W}/\text{cm}^2$  Rotlicht konnten durchschnittlich 81% der Fliegen innerhalb 15 Tagen ihr Aktivitätsprofil dem RD nach dem Shift stabil angleichen. Eine helligkeitsabhängige Verkürzung der Dauer der zu Resynchronisation benötigten Zeit konnte registriert werden. Bei einer Rotlichtintensität von  $0,02\mu\text{W}/\text{cm}^2$  wurden für eine stabile Anpassung der Phasen an den RD für Morgen- und Abendpeak 12 Tage benötigt. Bei der Erhöhung der Rotlichtdosis senkte sich die benötigte Zeit auf 7,5 Tage im Morgenpeak und 8 Tage im Abendpeak (Abb. 32 und 34). Die Freilaufperiode ( $\tau$ ) in DD lag bei 24,08h.



1



2



**Abb. 34: Benötigte Zeit, die zur stabilen Resynchronisation auf den geschifteten RD in einem Zeitraum von 15 Tagen benötigt war.**

1. Durchschnittliche Anzahl der Tage, die zur Resynchronisation des Morgen- und Abendpeaks bei Rotlichtintensitäten von (a)  $0,02\mu\text{W}/\text{cm}^2$ , (b)  $0,04\mu\text{W}/\text{cm}^2$  und (c)  $0,08\mu\text{W}/\text{cm}^2$  benötigt waren. Darstellung der Daten im Vergleich der Einzelexperimente Die Gesamtzahl (n) der gewerteten Fliegen ist über den Histogrammen dargestellt.

2. Darstellung der Daten getrennt nach Genotyp in Abhängigkeit zur Rotlichtintensität. Die Zahl (n) der gewerteten Fliegen ist über den Säulen der Histogramme dargestellt.

Das Resynchronisationsvermögen der Rh7 knock-out Mutante bei einer Rotlichtintensität von  $0,02\mu\text{W}/\text{cm}^2$  war mit 73% ähnlich dem Resynchronisationsvermögen der Revertante von 74%. Im Unterschied zur Revertante resultiert die Erhöhung der Rotlichtintensität auf  $0,04\mu\text{W}/\text{cm}^2$  in einer Resynchronisationsrate von 95%. Bei einer Intensität von  $0,08\mu\text{W}/\text{cm}^2$  Rotlicht konnten alle Fliegen der Revertante wie der Wildtyp innerhalb 15 Tagen ihr Aktivitätsprofil dem RD nach dem Shift stabil angleichen (Abb. 33). Auch in der knock-out Mutante war die im Wildtyp und der Revertante erkennbare Tendenz der Verkürzung der zum Resynchronisieren benötigten Zeitdauer durch Erhöhen der Rotlichtintensität erkennbar. Bei  $0,02\mu\text{W}/\text{cm}^2$  wurden mehr als 10 Tage (10,5), bei einer Intensität von  $0,08\mu\text{W}/\text{cm}^2$  Rotlicht nur 5 Tage im Morgenpeak und 5,5 Tage im Abendpeak benötigt (Abb. 34). Die Rh7 knock-out Mutante resynchronisierte schneller als die Revertante zum RD nach dem Shift und benötigte eine geringe, mit dem Wildtyp *yw;+;+* vergleichbare Zeit. Das für Rh7 knock-out Fliegen charakteristische Einzelaktogramm spiegelte dieses Verhaltensmuster wieder (Abb. 32). Die durchschnittliche Periodenlänge ( $\tau$ ) im Freilauf im DD betrug 24,23 h.

Die Überexpression des RH7-Proteins in der Linie *yw;Rh1-Rh7;+* bewirkte keine gravierenden Unterschiede in der Dauer des Resynchronisationsverhaltens im Vergleich mit der knock-out Mutante bzw. auch der Revertante. Ähnlich dieser Genotypen konnten 71% der *yw;Rh1-Rh7;+* Fliegen bei einer Intensität von  $0,02\mu\text{W}/\text{cm}^2$  Rotlicht innerhalb von 15 Tagen ihr Aktivitätsprofil dem RD nach dem Shift anpassen. Eine Erhöhung der Lichtintensität resultierte in einer Erhöhung des Prozentsatzes synchronisierter Fliegen, bei einer Rotlichtintensität von  $0,08\mu\text{W}/\text{cm}^2$  waren bereits 95% der Fliegen resynchronisiert (Abb. 33). Zeitlich war das Resynchronisationsvermögen mit der Revertante vergleichbar, 12 Tage (Morgenpeak) und 11,5 Tage (Abendpeak) wurden bei einer Intensität von  $0,02\mu\text{W}/\text{cm}^2$  benötigt. Die Erhöhung auf  $0,04\mu\text{W}/\text{cm}^2$  in einem Folgeexperiment resultierte in einer Verkürzung der Resynchronisationsdauer auf 7 Tage (Morgenpeak) bzw. 6,5 Tage im Abendpeak. Bei einer Intensität von  $0,08\mu\text{W}/\text{cm}^2$  Rotlicht wurden ebenso 7 Tage im Morgenpeak und 6,5 Tage im Abendpeak benötigt (Abb. 34). In dem für die Linie *yw;Rh1-Rh7;+* charakteristischen Einzelaktogramm zeigt sich, dass die Verschiebung des Abendpeaks durch Aktivität, resultierend aus positiven Maskingeffekten durch das Rotlicht des geshifteten RD ab Tag 8, verdeckt wurde (Abb. 32). Die Auswertung der Shiftdauer wurde dadurch erschwert. Maskingeffekte traten im Morgenpeak nicht auf (Abb. 32). Die Periode im Freilauf im DD war kürzer als 24h und lag bei  $\tau = 23,88\text{h}$ .

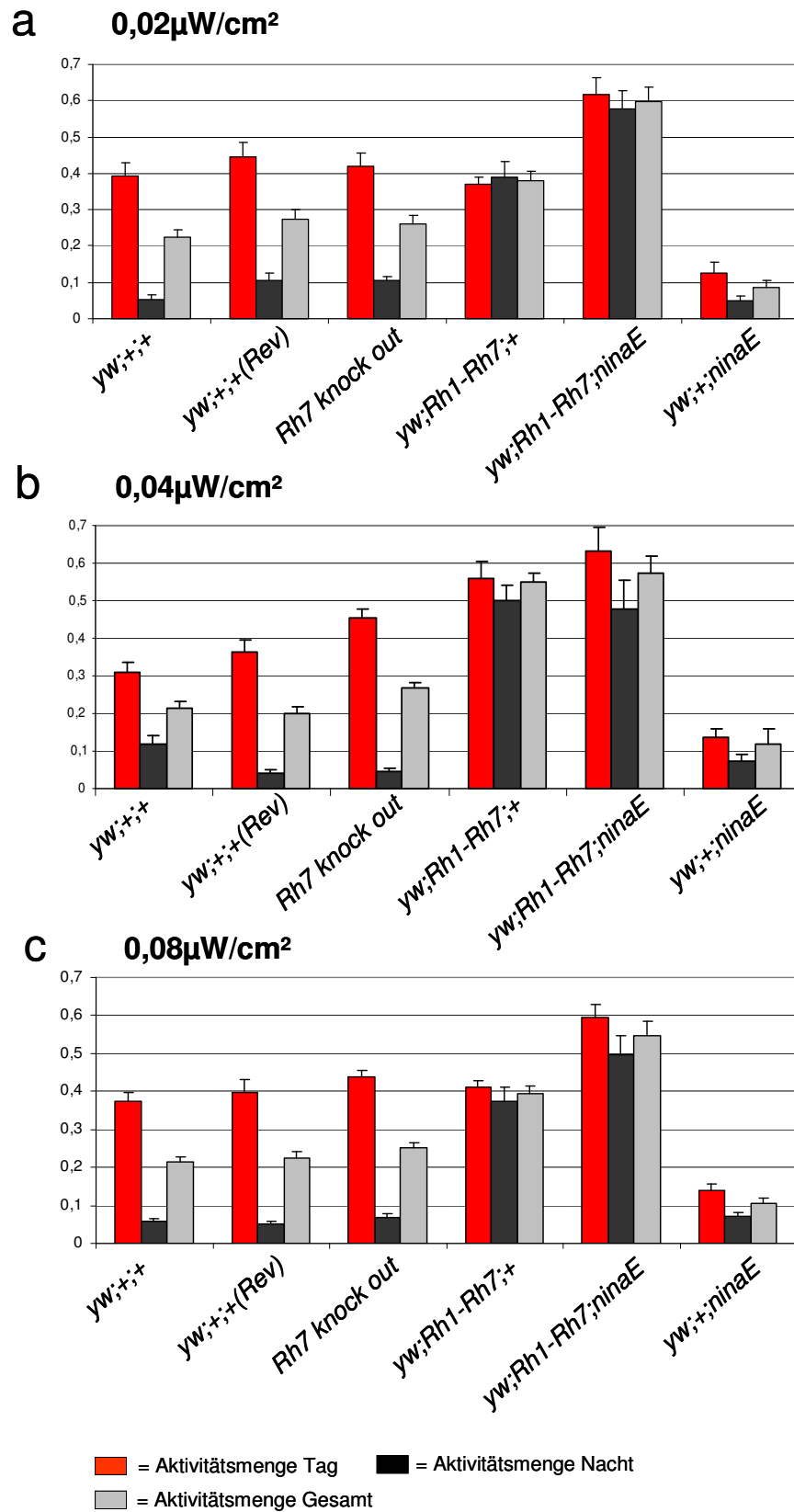
Die Fliegen des Stammes *yw;Rh1-Rh7;+* konnten mit dem Anfangs verabreichten RD zu 100% synchronisiert werden. Im Unterschied dazu konnten Fliegen der Linie *yw;Rh1-Rh7;ninaE* durchschnittlich nur zu 78% im RD synchronisiert werden, ein Anteil von 22% der Fliegen war nicht rhythmisch im RD (Abb. 32).

Das Resynchronisationsvermögen der Linie *yw;Rh1-Rh7;ninaE* war bedeutend schwächer ausgeprägt als in den bisher beschriebenen Linien. Das Resynchronisationsvermögen dieser Fliegen bei einer Rotlichtintensität von  $0,02\mu\text{W}/\text{cm}^2$  lag bei nur 12%, 19% der Fliegen konnten innerhalb 15 Tagen ihr Aktivitätsprofil dem RD nach dem Shift bei einer Rotlichtintensität von  $0,04\mu\text{W}/\text{cm}^2$  angleichen. Nur ein Drittel der Fliegen (33%) resynchronisierte bei  $0,08\mu\text{W}/\text{cm}^2$  Rotlicht (Abb. 33). Es war bei einer Rotlichtintensität von  $0,02\mu\text{W}/\text{cm}^2$  ein Zeitraum von 15 Tagen zur Resynchronisation des Morgenpeaks und ein Zeitraum von 14 Tage zur Resynchronisation des Abendpeaks nötig. Im Experiment mit einer Rotlichtintensität von  $0,04\mu\text{W}/\text{cm}^2$  war die Resynchronisation etwas früher vollzogen, der Morgenpeak war nach durchschnittlich 9 Tagen und der Abendpeak nach 10 Tagen resynchronisiert. Durch eine Erhöhung der Rotlichtintensität auf  $0,08\mu\text{W}/\text{cm}^2$  war dieser Prozeß nach 8 (Morgenpeak) bzw. 9 Tagen (Abendpeak) abgeschlossen. (Abb. 34). Da nur ein Teil der Tiere zur Resynchronisation befähigt war, wurden zwei Aktogramme der Linie *yw;Rh1-Rh7;ninaE* abgebildet. Das erste Aktogramm war charakteristisch für eine Fliege, die in einem Zeitraum von 15 Tagen bei einer Intensität von  $0,08\mu\text{W}/\text{cm}^2$  Rotlicht ihr Aktivitätsprofil resynchronisieren konnte (Abb. 32). Die Mehrzahl der sehr aktiven Tiere war unfähig zu resynchronisieren. Wie im Aktogramm 2 (Abb. 32) repräsentiert, war die Synchronisation zum RD für einen Großteil der Tiere nicht möglich, der Freilauf der endogenen Periode wurde erkennbar (Abb. 32). Die Aktivität in der Dunkelheit und die Repression der Aktivität im Rotlicht wurde– wie im Aktogramm 2 ersichtlich war– durch den Effekt des paradoxen Maskings hervorgerufen (Mrosovsky et al., 1999) (Abb. 32). Etwa 15-20% der Tiere verstarben nach 2-3 Wochen des Experimentverlaufs. Die Freilaufperiode ( $\tau$ ) der Linie *yw;Rh1-Rh7;ninaE* in DD war länger als die Freilaufperiode des Stammes *yw;Rh1-Rh7;+* (23,88h) und betrug 24,39h.

Die *Rh1*-Mutante *yw;+;ninaE* war bis auf wenige Individuen im RD nicht synchronisierbar. Bei einer Rotlichtintensität von  $0,04\mu\text{W}/\text{cm}^2$  und bei einer Intensität von  $0,08\mu\text{W}/\text{cm}^2$  konnte je eine Fliege in einem Zeitraum von 8-10 Tage ihre Aktivitätsprofil nach dem Shift resynchronisieren. Eine nur sehr geringes Aktivitätsniveau erschwerte die Bewertung. Eine nähere Charakterisierung des Genotyps ist am Anfang dieses Abschnittes zu finden (Abb. 30).

Des Weiteren wurden die durchschnittlichen Aktivitätsmengen der Fliegenstämme für die Lichtphase, für die Aktivität in der Dunkelheit und das Gesamtaktivitätsniveau berechnet. Ein für den Wildtyp typischer, deutlich höherer Aktivitätspegel in der Lichtphase im Vergleich zur Dunkelheit war in allen Experimentansätzen, unabhängig von der Intensität des Rotlichts erkennbar (Abb. 35). Die Aktivierung durch das Licht und die Hemmung der Aktivität in der Dunkelheit war in einem, dem Wildtyp ähnlichen Aktivitätsspiegel in der Revertante und der knock-out Mutante nachvollziehbar. Auch in diesen Stämmen resultierten die Unterschiede in der

Rotlichtintensität der Einzelexperimente in keiner deutlichen Veränderung des Aktivitätspiegels (Abb. 35). Die Integration des Rh1-Rh7-, „Überexpressionskonstrukts“ in den Wildtyp-Hintergrund *yw;+;+* bzw. in den *ninaE*-Hintergrund resultierte in einer erheblichen Veränderung des Aktivitätsmusters. Die Fliegen beider Stämme wurden vermehrt in der Dunkelheit aktiv, es konnte ein nahezu gleich hoher Aktivitätsspiegel in der Nacht wie am Tag festgestellt werden. (Abb. 35). Diese Tendenz bestätigte sich in allen durchgeführten Experimenten bei Rotlichtintensitäten von  $0,02\mu\text{W}/\text{cm}^2$ ,  $0,04\mu\text{W}/\text{cm}^2$  und  $0,08\mu\text{W}/\text{cm}^2$ . In den beiden Stämmen *yw;Rh1-Rh7;ninaE* und *yw;Rh1-Rh7;+* konnte ein gravierend erhöhter Aktivitätsspiegel im Vergleich zum Aktivitätsniveau des Wildtypstammes, der Revertante und der knock-out Mutante in der Tagesaktivität und Nachtaktivität festgestellt werden. Bei einer Rotlichtintensität von  $0,08\mu\text{W}/\text{cm}^2$  war die Tagesaktivität der Überexpressionslinie mit der Aktivität des Wildtyps, der Revertante und der knock-out Mutante vergleichbar (Abb. 35). Der gravierendste Unterschied in der Gesamtaktivitätsmenge war zwischen den Linien *yw;Rh1-Rh7;ninaE* und der Linie *yw;+;ninaE* zu verzeichnen. Die Insertion des Rh1-Rh7-Konstrukts in die *ninaE*-Fliegen bewirkte eine deutliche Erhöhung des Aktivitätsniveaus der sehr wenig aktiven *yw;+;ninaE*-Fliegen (Abb. 35).



**Abb. 35: Vergleich der Aktivitätsmengen der Fliegen in RD-Zyklen**  
 Rot: Aktivität im Rotlicht; Schwarz: Aktivität in der Dunkelheit; Grau: Gesamtaktivität.  
 RD-Zyklus bei Rotlichtintensitäten von (a)  $0,02\mu\text{W}/\text{cm}^2$ , (b)  $0,04\mu\text{W}/\text{cm}^2$  und (c)  $0,08\mu\text{W}/\text{cm}^2$ .

### 3.3.2.3. Dauerrotlichtexperiment zur Charakterisierung der Rolle von RH7 als Rotlichtrezeptor

Die Fliegen wurden in einem RL-Zyklus (12:12) mit  $203,4\mu\text{W}/\text{cm}^2$  Rotlicht und einer Weisslichtintensität von  $29,28\mu\text{W}/\text{cm}^2$ , synchronisiert. Im weiteren Verlauf des Experiments wurde das Verhalten der Tiere in Dauerrotlicht (RR) mit einer Intensität von  $203,4\mu\text{W}/\text{cm}^2$  aufgezeichnet. Das Verhalten der Wildtyp-Fliegen *yw;+;+*, der Rh7 knock-out Mutante, der Linien *yw;Rh1-Rh7;+*, *yw;Rh1-Rh7;ninaE* und des Stammes *yw;+;ninaE* im RR wurde verglichen.

Es zeigte sich, dass die Fliegen eines Stammes meist nicht einheitlich auf den Wechsel des Lichtprogramms reagierten, wodurch eine eindeutige Zuordnung von Verhaltensmustern bei der Analyse der Verhaltensdaten erschwert wurde. Es konnten jedoch diverse, für alle getesteten Stämme charakteristische Aktivitätsgrundmuster erkannt werden. Eine Übersicht über die Einteilung der Verhaltensmuster wurde in Tabelle 10 aufgeführt.

**Tab. 10: Einteilung erkennbarer Verhaltensgrundmuster im RR-Experiment**

Erste Reihe: Angabe der Gesamtzahl getesteter Fliegen.

Vergleich der Aktivitätsprofile der getesteten Stämme im RR mit Angabe der Anzahl und Anteil der Fliegen eines Stammes, deren Verhalten charakteristisch für das in der linken Säule der Tabelle beschriebene Verhaltensmuster ist. Die Periodenlängen ( $\tau$ ) sind die Mittelwerte der berechneten Periodenlängen eines Genotyps.

<b>Fliegen- stamm</b>	<i>yw;+;+</i>	<i>Rh7 knock- out</i>	<i>yw;Rh1-Rh7;+</i>	<i>yw;Rh1- Rh7;ninaE</i>	<i>yw;+;ninaE</i>
<b>Verhaltens- Muster in RR</b>					
<i>Gesamtzahl der Tiere</i>	20	37	18	28	5
Freilauf; $\tau \sim 24\text{h}$	1 (5%)	10 (28%)	0	12 (42%)	0
Splitting; Freilauf in Tag 1-4; ab Tag 5: 1 Komponente: $\tau > 24\text{h}$	0	0	9 (50%) $\tau_{(\text{Tag 1-4})}$ : 26,3 $\tau_{(\text{ab Tag 5})}$ : 24,5	2 (8%) $\tau_{(\text{Tag 1-4})}$ : 25,5 $\tau_{(\text{ab Tag 5})}$ : 24,3	0
Splitting; Freilauf in Tag 1-4; ab Tag 5: 1 Komponente: $\tau \sim 24\text{h}$	5 (25%)	9 (26%)	3 (16%)	6 (22%)	0
Splitting; Freilauf in Tag 1-4; ab Tag 5:	3 (15%) $\tau_{(\text{ab Tag 5})}$ :	6 (15%) $\tau_{(\text{ab Tag 5})}$ :	0	0	0

1 Komponente: $\tau < 24h$	23,6	23,5			
Interne Desynchronisation	9 (45%)	5 (14%)	6 (33%)	5 (19%)	0
Arrhythmie	2 (10%)	7 (17%)	0	3 (9%)	5 (100%)

Durch das Dauerrotlicht wurde bei dem Großteil (40%) der Wildtypfliegen *yw;+;+* eine Interne Desynchronisation festgestellt (Tab. 10 und Abb. 36). Dies bedeutete, dass nach Transfer der Fliegen in Dauerrotlicht das Aktivitätsprofil durch den Freilauf einer kurzperiodischen und einer langperiodischen Komponente, gekennzeichnet durch das Kreuzen von Aktivitätskomponenten nachweisbar war (Abb. 36). Bei einem Anteil von 40% der Fliegen konnte auch „Splitting“ beobachtet werden, charakterisiert durch nur vorübergehenden Freilauf einer lang- und einer kurzperiodischen Komponente. Beide Aktivitätskomponenten verschmelzen beim Überkreuzen wieder zu einer Hauptkomponente (meist ab Tag 5). Die Periodenlänge des Aktivitätsbands der Gesamtkomponente lag bei 23,6 bzw. etwa 24h (Tab. 10 und Abb. 36). Nur eine Fliege war im Freilauf und 2 Fliegen waren arrhythmisch (Tab. 10).

Bei der *Rh7* knock-out Mutante war bei 27% der Fliegen im Freilauf eine Periodenlänge von etwa 24h zu erkennen (Tab. 10 und Abb. 36). Ein Anteil von knapp 40% zeigte Splitting, ähnlich wie die Wildtypfliegen mit einer Periodenlänge der Einzelkomponente von 23,6 bzw. etwa 24h. Im Unterschied zu den Wildtypfliegen wurde aber in nur 14% der knock-out Fliegen eine Interne Desynchronisation beobachtet (Tab. 10). Die Anwendung des *Chi*<sup>2</sup>-Tests deutete auf signifikante Unterschiede zwischen der knock-out Mutante und den *yw;+;+*-Fliegen hin ( $p = 0,027$ ;  $d(f) = 3$ ).

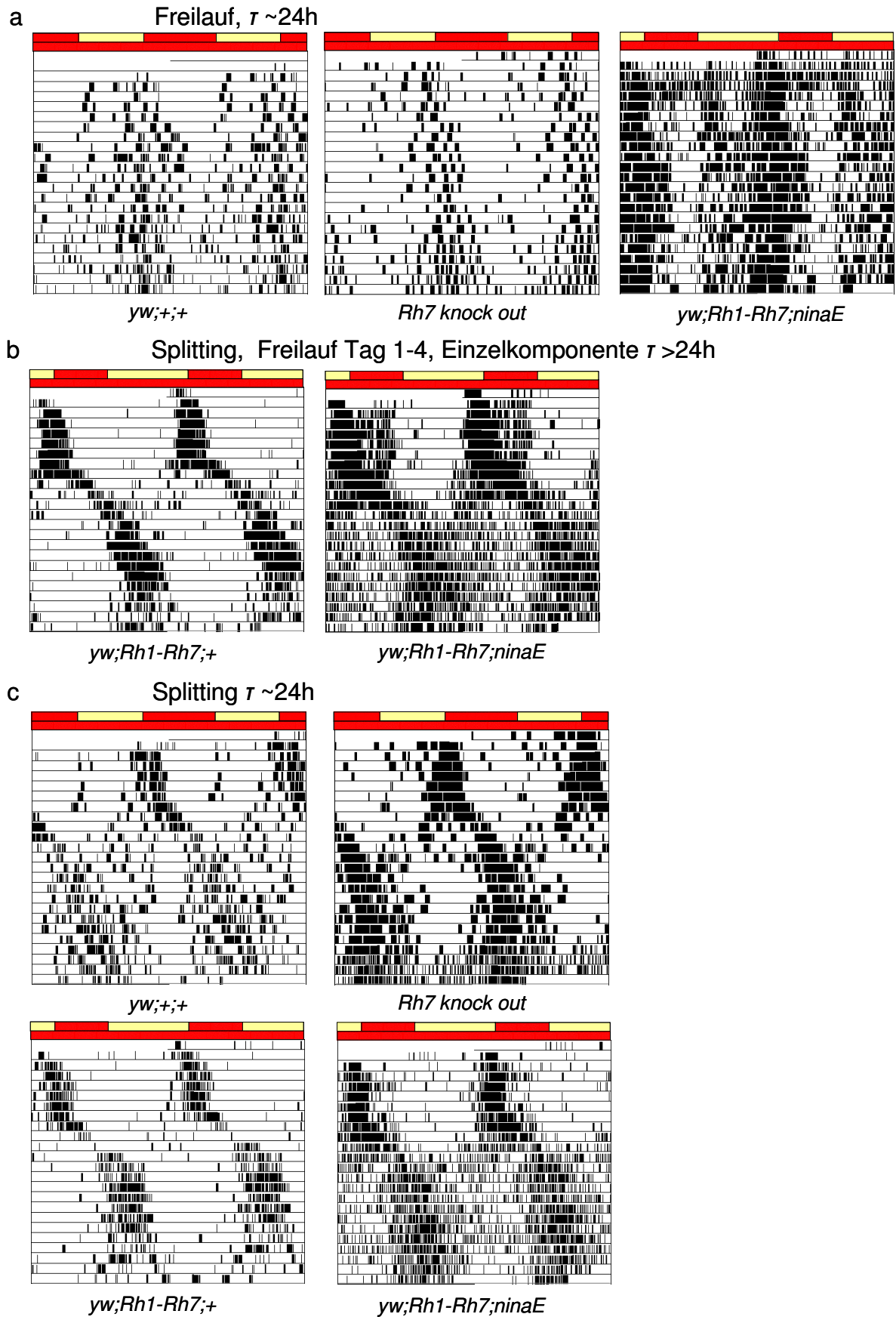
Bei der Hälfte der Fliegen des Stammes *yw;Rh1-Rh7;+* konnte Splitting beobachtet werden, jedoch mit der Besonderheit, dass die Periodenlänge der deutlich langperiodischen Komponente im Freilauf ( $\tau_{\text{(Tag 1-4)}}$ : 26,3) mit sehr hoher Aktivität gekennzeichnet war (Abb. 36). Durch das Verschmelzen mit der zweiten, schwach ausgeprägten, kurzperiodischen Komponente, ab etwa Tag 5 in RR, wurde eine Periodenlänge der Einzelkomponente von knapp über 24h berechnet ( $\tau_{\text{(ab Tag 5)}}$ : 24,5) (Abb. 36). Nur 8% der Fliegen des Stammes *yw;Rh1-Rh7;ninaE* zeigten auch diese Verhaltensmuster. Interne Desynchronisation konnte in 33% der *yw;Rh1-Rh7;+*-Fliegen beobachtet werden und in 19% der Fliegen des *yw;Rh1-Rh7;ninaE*-Stammes (Tab. 10). Ein Anteil von 16% *yw;Rh1-Rh7;+*-Fliegen zeigte Splitting, ähnlich wie 22% der *yw;Rh1-Rh7;ninaE*-Fliegen mit einer Periodenlänge der Einzelkomponente von etwa 24h (Tab. 10 und Abb. 36). Ein erheblicher Unterschied im Verhalten der beiden Stämme bestand in der Tatsache, dass der größte Anteil der *yw;Rh1-Rh7;ninaE*-Fliegen (43%) auf den Wechsel des Lichtprogramms auf RR mit Freilauf bei einer Periodenlänge von etwa 24h reagierte, dies jedoch in keiner *yw;Rh1-Rh7;+*-Fliege nachgewiesen werden konnte (Tab. 10). Ein weiterer Unterschied bestand darin, dass Splitting in 66% der getesteten *yw;Rh1-Rh7;+*-Fliegen, aber nur in 30% der *yw;Rh1-Rh7;ninaE*-

Fliegen auftrat. Die Anwendung des  $\chi^2$ -Tests belegte, dass signifikante Unterschiede zwischen den Stämmen *yw;Rh1-Rh7;+* und *yw;Rh1-Rh7;ninaE* bestehen ( $p=0,002$ ;  $d(f)=3$ ).

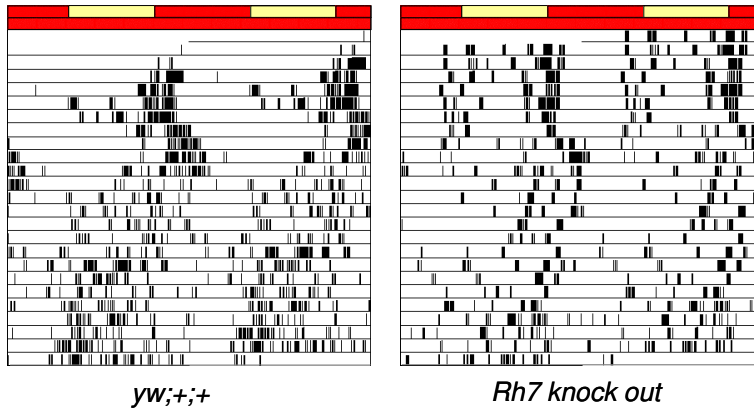
Das Ergebnis des  $\chi^2$ -Tests zum Vergleich der bisher genannten Stämme deutete auf signifikante Unterschiede aller Stämme untereinander hin ( $p=0,002$ ;  $d(f)=9$ ). Es sollte jedoch darauf hingewiesen werden, dass dieser Test unter Vorbehalt durchgeführt wurde, da einerseits die Anzahl der Fliegen, die getestet wurden relativ gering war, und andererseits auch mit Einzelwerten, die mit der Zahl 0 belegt waren, kalkuliert wurde.

Zur Kontrolle wurden auch Fliegen des Stammes *yw;+;ninaE* getestet. Aufgrund sehr geringer Lokomotoraktivität und hoher Mortalität konnten nur Verhaltensdaten von 5 Tieren aufgezeichnet werden. Diese Tiere waren arrhythmisch (Tab. 10).

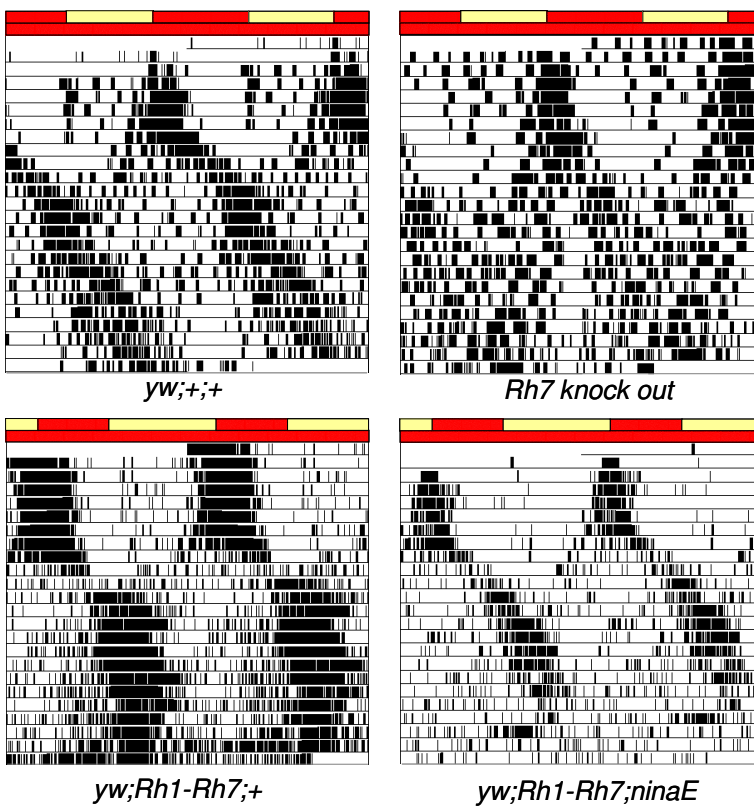




d Splitting  $\tau < 24h$



e Interne Desynchronisation



f Freilauf, lange Periode



**Abb. 36: Beispielaktogramme (Doppelplot), die die Verhaltensgrundmuster der getesteten Stämme im RR-Experiment widerspiegeln**

(a) Fliegen der Stämme *yw;+;+*, *Rh7 knock-out* und *yw;Rh1-Rh7;ninaE*, die im RR mit Freilauf von etwa  $\tau \sim 24\text{h}$  reagieren. (b) Splitting in RR bei den Stämmen *yw;Rh1-Rh7;+* und *yw;Rh1-Rh7;ninaE*, nach Vereinigung der Aktivitätskomponenten wurde Freilauf mit  $\tau > 24\text{h}$  festgestellt. (c) Splitting mit einer Periode von  $\tau \sim 24\text{h}$  wurde in allen getesteten Stämmen vorgefunden. (d) Splitting mit einer Periode von  $\tau < 24\text{h}$  im Wildtyp und in der knock-out Mutante. (e) Interne Desynchronisation konnte in allen getesteten Stämmen nachgewiesen werden. (f) Freilauf mit langer Periodenlänge konnte nur in *yw;Rh1-Rh7;ninaE*-Fliegen beobachtet werden.

## 4. Diskussion

Die Etablierung von transgenen Stämmen, die unter Kontrolle des Rh1-Promotors das *rh7*-Gen exprimieren, hat entscheidend zur funktionellen Analyse des bisher unbekannten Proteins RH7 in *D. melanogaster* beigetragen. Histologische Nachweise bezeugen, dass RH7 in R1-6 im Rh1 knock-out Hintergrund (*yw;Rh1-Rh7;ninaE*-Fliegen) fähig ist, eine wildtypische Rhabdomerstabilität zu generieren und damit eine Photorezeptordegeneration zu verhindern. Darüberhinaus attestieren die Ableitungen von ERG's die Funktionalität von RH7 als Photorezeptor. Des Weiteren konnte eine Rh7 knock-out Mutante hergestellt werden, die im Vergleich zum Wildtyp in verschiedenen Experimentansätzen signifikant unterschiedliche Verhaltensmuster aufweist.

### 4.1. RH7 ist ein Photorezeptor in *D. melanogaster*

#### 4.1.1 ERG-Studien bezeugen die Funktionalität von RH7 als Photopigment

Schon in früheren Experimenten wurde der *ninaE*-Promotor verwendet, um erfolgreich die ektopische Expression von transgenen Opsin-Konstrukten in R1-6 zu gewährleisten. Die Integration der Transgene in den *ninaE*<sup>17</sup>-Hintergrund gewährleistete, dass das Transgen das einzige Rhodopsin in R1-6 war (O' Tousa et al., 1985; Zuker et al., 1985, 1988; Feiler et al., 1988, 1992). Diese etablierte Methodik ermöglichte die spektrale und photochemische Analyse der Rhodopsine 3 und 4 (Feiler et al., 1992), und diente des Weiteren der Isolation und Charakterisierung weiterer, nur schwach exprimierter Rhodopsine, Rh5 (Chou et al., 1996) und Rh 5 und 6 (Salcedo et al., 1999). Im ERG konnte bei der Ableitung des Laminapotentials, das von R1-6 hervorgerufen wird, ein wildtypisches *ON*- und *OFF*-Signal registriert werden, welches die Funktionalität der Photorezeptoren Rh5 und Rh6 bewies (Chou et al., 1996, Salcedo et al., 1999). Es sei darauf hingewiesen, dass nachweislich das *ON*-Signal nur durch Ableitung aus der Lamina und daher von R1-6 erzeugt wird, und ein Signal aus R7/8 nicht in das Laminapotential mit einfließt (Heisenberg, 1971). Die Rh1 Mutante (*ninaE*<sup>17</sup>) zeigte kein *ON*- und *OFF*-Signal (Chou et al., 1996; Bentreop et al., 1997; Kumar et al., 1997; Salcedo et al., 1999). Dieses Ergebnis wird durch Messergebnisse von Pia Gartmeier (Diplomandin, am Lehrstuhl) bestätigt (siehe Abb. 27). Die erste Ableitung des ERG's der wildtypischen Fliegen beweist die Funktionalität des Photorezeptors Rh1 in R1-6 im *yw;+;+*-Stamm. Ein *ON*- und *OFF*-Signal ist deutlich zu sehen (siehe Abb. 27). Die Messergebnisse der ERG's des transgenen Stammes *yw;Rh1-Rh7;ninaE*

zeigen, dass das Protein RH7 ein funktioneller Photorezeptor von *D. melanogaster* ist. In der ersten Ableitung der ERG's dieser Fliegen ist ein deutliches *ON*- und *OFF*-Signal nachweisbar, obgleich die Amplitude der Signale nicht die Höhe des Signal des Wildtyps erreicht (siehe Abb. 27). So konnte durch eine erneute Anwendung der Methodik der Isolation und Expression eines einzigen Proteins in R1-6 im *ninaE*<sup>17</sup>-Hintergrund wie bei der Analyse der Rhodopsine Rh5 und Rh6 die Funktionalität eines Photorezeptors bewiesen werden (Chou et al., 1996, Salcedo et al., 1999).

#### 4.1.2. RH7 in R1-6 rettet den Phänotyp der Augen in *yw;Rh1-Rh7;ninaE*-Fliegen

Ein weiterer Hinweis, der RH7 die Rolle eines funktionellen Rhodopsins attestiert, ist die Charakterisierung des histologischen Zustands der Rhabdomere in der Retina im Komplexauge der Taufliegen. Tangentialschnitte von Semidünnschnitt-Präparaten der Retina von 25-28 Tagen alten Wildtyp-Fliegen lassen eine normale Entwicklung der peripheren Photorezeptoren R1-6 sowie der zentralen Photorezeptoren (R7/8) unter Ausbildung stabiler Rhabdomere erkennen (siehe Abb. 24). Tangentialschnitte der Retina der *yw;Rh1-Rh7;+*-Fliegen deuten auch auf eine normale Entwicklung der Rhabdomere hin (siehe Abb. 24). Bei genauer Betrachtung der Photorezeptorfläche des Stammes *yw;+;ninaE* ist der Verlust der Rhabdomere in R1-6 nachweisbar, im Querschnitt eines Ommatidiums sind nur die Rhabdomere von R7 oder R8 vorhanden (siehe Abb. 24). Ein signifikant höherer Grad des Verlustes der Photorezeptorfläche durch Vakuolisierung ist im Vergleich zum Wildtyp zu beobachten (siehe Abb. 25). Die offensichtliche Rezeptordegeneration im Phänotyp des Stammes *yw;+;ninaE* wird vielfach durch Ergebnisse anderer Studien bestätigt (O' Touse et al. 1989; Leonard et al., 1992; Kumar und Ready, 1995; Acharya et al., 2004; Ahmad et al., 2007; Wang und Montell, 2007). Tangentialschnitte der Retina von *yw;Rh1-Rh7;ninaE*-Fliegen zeigen eine wildtypische Entwicklung der Rhabdomere von R7 und 8 aber auch R1-6 auf (siehe Abb. 24). Die Rettung des wildtypischen Phänotyps kann durch Expression von RH7 in R1-6 bewerkstelligt werden. Studien mit bovinen Rhodopsinen, die ektopisch unter Kontrolle des Rh1 Promotors in *Drosophila* exprimiert wurden, zeigten nach dem Schlüpfen wildtypische Rhabdomere, diese degenerierten aber nach 7-14 Tagen (Ahmad et al., 2007). Es wird postuliert, dass für die Aufrechterhaltung der Rhabdomerstabilität über diese Zeitspanne hinaus der cytoplasmatische Teil aus dem C-terminalen Bereich von funktionellen *Drosophila*-Rhodopsinen (untersucht an Rh1) benötigt wird (Ahmad et al., 2007). Auch RH7 weist den für *Drosophila*-Rhodopsine typischen C-terminalen Bereich auf (flybase). Die in dieser Arbeit untersuchten Taufliegen waren mindestens 25 Tage alt, und die Rhabdomere der *yw;Rh1-Rh7;ninaE*-Fliegen sind zu diesem Zeitpunkt nach wie vor histologisch wildtypisch „gesund“ (siehe Abb. 24). Dies deutet wiederum darauf hin, dass RH7

ein funktionelles Rhodopsin der Taufliege sein könnte. Auch Studien an transgenen Stämmen, die die funktionellen Rhodopsine Rh5 bzw. Rh6 ektopisch in R1-6 exprimieren, bestätigen, dass die Stabilität der Rhabdomere auch nach einem längeren Zeitraum gewährleistet wird (Chou et al., 1996, Salcedo et al., 1999).

Diese histologischen Untersuchungen bestätigen, dass das RH7-Protein anstelle von Rh1 in R1-6 eine mit dem Wildtyp vergleichbare Stabilität der Rhabdomere gewährleistet.

#### 4.1.3. Verhaltensexperimente bestätigen die Funktionalität von RH7 als Photorezeptor

In dieser Arbeit sind mehrere Verhaltensexperimente durchgeführt worden, die die Rolle von RH7 als funktioneller Photorezeptor in *D. melanogaster* bestätigen. In den Experimenten ist eine mögliche Rolle von RH7 als Rotlichtrezeptor bzw. als Schwachlichtrezeptor untersucht worden.

Durch Vergleich des Verhaltens einer wildtypischen Fliege mit einer Rh7 knock-out Fliege konnten signifikante Unterschiede in der Rezeption und damit dem Verhalten bei niedrigen Lichtverhältnissen, der hier genannten Schwachlichtrezeption verzeichnet werden. Des Weiteren zeigte sich, dass auch in der Rotlichtrezeption deutliche Unterschiede im Verhalten der transgenen Stämme mit der Rh7 knock-out Mutante und dem Wildtypen auftraten. Die Verhaltensdaten werden im Speziellen im Kapitel 4.3. dieser Arbeit diskutiert.

Zusammenfassend kann bestätigt werden, dass RH7 ein funktioneller Photorezeptor der Taufliege *D. melanogaster* ist. Die ERG-Studien beweisen die Lichtempfindlichkeit des Proteins. Darüberhinaus wird durch Expression des RH7-Proteins in R1-6 anstelle von Rh1 die Photorezeptordegeneration im *ninaE*-Hintergrund verhindert, eine wildtypische Ausbildung der Rhabdomere kann beobachtet werden. Die Funktionalität des Photopigments RH7 kann darüberhinaus auch anhand von Verhaltensdaten bestätigt werden.

## 4.2. Analyse des Expressionsmusters von RH7

### 4.2.1. Hinweise auf ein geringes Expressionsniveau von RH7 im Wildtyp

Der sog. „*Flyatlas: Drosophila adult expression atlas*“ ist eine Datenbank, die basierend auf der Analyse von Microarraystudien (*Affymetrix Dros2 expression arrays*) an *CantonS* Wildtyp-Fliegen die gewebespezifische Transkriptionsrate nahezu aller *Drosophila*-Gene veröffentlicht. In nur etwa ¼ der Microarrays wird ein RH7 Signal knapp über der Detektionsgrenze nachgewiesen. Diese Daten unterstützen Ergebnisse von Microarray-Analysen von Ch. Grünewald und J. A. Botella (persönliche Mitteilung), in denen Rhodopsin 7 kaum detektiert wurde und stets als „absent“ gewertet wurde. Im Vergleich dazu wurde in jedem Microarray für Rh1 ein 200-300fach

stärkeres Signal nachgewiesen und als „present“ eingestuft. Das Expressionsniveau von RH7 kann daher als äußerst gering eingestuft werden, da vergleichsweise auch das nur in der R8 exprimierte *rh6*-Gen eine 30-40fach höhere Transkriptionsrate als RH7 aufweist.

Die Western Blot Analyse zur Detektion des RH7-Proteins in Köpfen der Wildtypfliegen *yw*;+;+, des Stammes *yw*;+;*ninaE* und des Überexpressionsstammes *yw*;*Rh1-Rh7*;+ lassen nur eine Bande beim Stamm *yw*;*Rh1-Rh7*;+ erkennen (siehe Abb.17). Die Proteinmenge bei den Stämmen *yw*;+;+, und *yw*;+;*ninaE* scheint unterhalb der Detektionsgrenze zu liegen. Diese Erkenntnis ist vergleichbar mit Ergebnissen von Chou (1996). Der Autor beschreibt die Expression des Photorezeptors Rh5 in R1-6. Das Protein konnte nur in dem Stamm, der Rh5 in R1-6 exprimiert durch Western Blot Analyse nachgewiesen werden, eine Detektion des ursprünglich nur in R8 exprimierten Rh5 Proteins in Wildtypfliegen schlug fehl (Chou et al., 1996).

Wie bereits erwähnt konnte das in dieser Arbeit gezeigte Western Blot Ergebnis nicht repliziert werden. Die Eignung des verwendeten Antikörpers (Rh7:E) erscheint fraglich. Während dieser Arbeit wurde die Herstellung eines neuen Anti-Rh7-Antikörpers in Auftrag gegeben. Es zeigte sich jedoch, dass dieser nicht geeignet war, da in affinitätsgereinigten IgG-Seren kein spezifisches Signal detektiert werden konnte.

Das als sehr gering einstuftbare Expressionsniveau von RH7 erschwert die funktionelle Analyse des photosensorischen Pigments erheblich. Eine „Maskierung“ der Funktion von RH7 durch die Rhodopsine R1-6, die im Vergleich zu RH7 wahrscheinlich deutlich überrepräsentiert sind, erscheint plausibel.

#### 4.2.2. Untersuchung der Lokalisation der RH7-Expression

In einem ersten Ansatz wurde das Expressionsmuster von GFP, das unter Kontrolle des Rh7-Promotors exprimiert wurde, untersucht. Neun Linien mit unterschiedlichen Insertionsorten wurden getestet. Es zeigte sich, dass hohe Unterschiede im Expressionsmuster innerhalb eines Genotyps auftreten und auch im Vergleich der Linien keine konsistente Markierung festgestellt werden kann (siehe Tab. 9 und Abb. 20). RH7 gilt als Kandidat für einen unbekannten Photorezeptor in den Dorsalen Uhrneuronen (Veleri et al., 2003) Die Expression von RH7 in den DN erscheint nach den bisherigen Ergebnissen unwahrscheinlich, da eine Koexpression von GFP mit dem Signal der PER-Antikörperfärbung in den DN nicht gefunden wurde (Abb. 20).

Die Überprüfung des Expressionsmusters von RH7 an wholemount-Gehirnpräparaten durch den Rh7:E Antikörper deutet aufgrund konsistenter Antikörperfärbung auf eine Expression von Rh7 in den Ocellen hin (siehe Abb. 21). Auch der Rh7:E-Antikörper färbte nur ausnahmsweise Zellen im dorsalen Protocerebrum (Abb. 21). Antikörperfärbungen von Gefrierschnitten an Wildtyp-Fliegen verweisen auf die Expression von RH7 in den Rhabdomeren der Ommatidien in der Retina (siehe

Abb. 21). Es handelt sich um eine spezifische Färbung des Rh7:E Antikörpers. Das Signal in den Kristallkegel ist ein unspezifisches Signal, da Kontrollfärbungen ohne primären Antikörper zeigen, dass der sekundäre fluoreszente Antikörper in diesen Strukturen unspezifisch angereichert wird (siehe Abb. 21).

Das Antikörpersignal in den Komplexaugen und Ocellen würde auf eine Koexpression von RH7 mit den bekannten Rhodopsinen Rh1-6 schliessen lassen. Das würde bedeuten, dass unter der Annahme, dass RH7 ein funktioneller Photorezeptor ist, in *D. melanogaster* zwei aktive Photorezeptoren in einer Rezeptorzelle existieren würden. Wie könnte die Zelle differenzieren, durch welchen Photorezeptor die Aktivierung der visuellen Transduktionskaskade vermittelt wird? In der Studie von Fein und Szuts (1982) wird postuliert, dass im Tierreich die Expression eines Photopigments in einer Zelle die Expression eines weiteren Pigments ausschliesst. Diese Anschauung galt lange als sinnesphysiologisches Dogma. Doch scheint es für die Insekten Ausnahmen zu geben: Vielerlei Arbeiten weisen auf die Expression multipler visueller Pigmente in einer Rezeptorzelle hin (Sakamoto et al., 1996; Kitamoto et al., 1998). Hinweise auf die Funktionalität der Pigmente, z.B. die Fähigkeit der Aktivierung der Phototransduktionskaskade gab es jedoch lange keine. Dies wurde erstmalig im Jahre 2003 explizit an japanischen Schwalbenschwänzen (*Papilio xuthus*) untersucht (Arikawa et al., 2003). Die proximalen Rezeptorzellen R5-8 beinhalten die Opsine PxL2 und PxL3, deren Absorptionsmaxima bei 515 und 575nm liegen und zusammen für eine abnormale spektrale „Breitband-Sensitivität“ sorgen (Arikawa et al., 2003). Die Aktivierung der identischen Signalkaskade durch die beiden unterschiedlichen Pigmente wird angenommen. Der biologische Sinn verbleibt spekulativ, eine generelle Unterstützung in der Lichtwahrnehmung wird diskutiert (Arikawa et al., 2003). Rein hypothetisch könnte in *Drosophila* die Koexpression von funktionellem RH1 und RH7 existieren, es erscheint allerdings kaum glaubwürdig, da kein Hinweis auf eine abnormale spektrale „Breitband-Sensitivität“ der Rezeptorzellen existiert (Salcedo et al., 1999).

Unter der Annahme, dass der Antikörper tatsächlich RH7 in R1-6 detektiert und daher die Koexpression von Rh1 und RH7 möglich erschiene, stellt sich die Frage, warum RH7 als funktionelles Pigment die Degeneration von Rhabdomeren im Stamm *yw;+;ninaE* nicht verhindert, da auch schon eine geringe Dosis (wie sie z.B. in stark hypomorphen Stämmen mit <1% vom Wildtyp-Rh1-Gehalt) funktionellem Rhodopsins ausreicht, um die Generierung ultrastrukturell intakter Rhabdomere zu ermöglichen (Leonard et al., 1992).

Die Signalstärke der Antikörperfärbung in Kryostatschnitten von *yw;+;+*-Fliegen und der transgenen Fliegen mit der Überexpression (*yw;Rh1-Rh7;+* und *yw;Rh1-Rh7;ninaE*), gemessen in R1-6 war etwa um den Faktor 2-3 höher (siehe Abb. 23). Nimmt man an, dass RH7 im Wildtyp eine äußerst geringe Transkriptionsrate aufweist (siehe Kapitel 3.2.1), und tatsächlich in den Komplexaugen exprimiert wird, dann erscheint das um den Faktor 2 bis 3 höhere Signal der



Antikörperfärbung bei Expression von RH7, getrieben durch den Rh1-Promotor, als sehr niedrig. Dies wird besonders deutlich, wenn man bedenkt, dass in Wildtypfliegen die Proteine der Rhabdomerenmembran zu etwa 65% aus Rh1 bestehen (Schwemer und Henning, 1984; Kumar et al., 1997).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Expressionsanalyse mit Hilfe der UAS-GFP-Konstrukte keine konkreten Hinweise auf den Expressionsort von RH7 liefern konnte. Auch die Eignung des verwendeten Antikörpers, Rh7:E, zur Lokalisation des RH7-Expressionsortes erscheint problematisch. So kann aufgrund des Antikörpersignals keine gesicherte Aussage über das Expressionsmuster von RH7 getroffen werden. Eine Koexpression von RH7 mit den Rh1-6 wäre aufgrund des vorliegenden Musters des Antikörpersignals denkbar, müsste aber durch weitere Untersuchungen gesichert werden. Unglücklicherweise war die im Rahmen dieser Arbeit in Auftrag gegebene Herstellung eines neuen Rh7-Antikörpers nicht erfolgreich.

### **4.3. Die Rolle von RH7 als circadianer Photorezeptor**

#### **4.3.1. Beschreibung des Phänotyps der Rh7 knock-out Mutante**

In dieser Arbeit wurde in einem ersten Experimentansatz eine mögliche Rolle von RH7 als Schwachlichtrezeptor untersucht. Durch den Einsatz einer „Rampe“ zur Simulation der Dämmerung wurde die Untersuchung der Lage der Aktivitätspeaks in Relation zur Lichtintensität ermöglicht. Diese Peaks treten bei Wildtyp-Fliegen stets bei einer bestimmten Lichtintensität, und zwar 5-10Lux auf (Rieger et al., 2007). In weiteren Experimenten sollte getestet werden, ob diese ermittelte Lichtintensität bei der Rh7-Mutante verändert ist.

Bereits in den LD-, LDR- und auch LMR-Durchschnittstagen kann man einen Effekt, der durch das Fehlen des Pigments RH7 ausgelöst wird, erkennen: Das Aktivitätsniveau in den Morgenpeaks dieser Lichtprogramme ist in der knock-out Mutante im Vergleich zur Revertante deutlich erhöht (siehe Abb. 28).

Um eine exakte Aussage über den Einfluss von RH7 auf die Lage der Aktivitätspeaks bei zu- bzw. abnehmender Lichtintensität in der Morgen- bzw. Abenddämmerung treffen zu können, ist die zeitliche Kalkulation der Lage der Peaks– wie dies in Abbildung 29 dargestellt ist– vonnöten. Es zeigen sich im Vergleich der Phänotypen der Rh7 knock-out Mutante mit der Revertante in LD Unterschiede in der Lage der Aktivitätspeaks: Die Lage des Morgen- wie auch des Abendpeaks beginnt früher in der knock-out Mutante (Abb. 29). Nach Änderung des Lichtprogramms durch Verwendung der Rampe lassen sich– wie im LDR erkennbar– durch das Fehlen des RH7-Proteins hervorgerufene Verhaltensänderungen im Vergleich zum wildtypischen Stamm mit RH7

(Revertante) auf das Lichtprogramm feststellen: beide Stämme reagieren auf den Zusatz der Dämmerungssimulation im Vergleich zum LD mit einem verspäteten Morgenpeak und verspäteten Abendpeak (Abb. 29).

Das Mondlicht im LMR-Zyklus bewirkt eine im Vergleich zum LDR erkennbare Verspätung des Morgenpeaks in beiden Linien, die Verschiebung der Peaks war in den beiden Linien signifikant verschieden: Das Fehlen des RH7-Proteins bewirkte eine signifikant geringere zeitliche Verschiebung des Morgenpeaks (Abb. 29). Ein weiterer Effekt, der durch das Fehlen des RH7 Proteins in der knock-out Mutante deutlich wird, ist der hoch signifikante Unterschied der Lage der Abendpeaks, das durch die nächtliche Illumination mit Mondlicht im LMR im Vergleich zu LDR auftritt. Die knock-out Mutante reagiert mit einem sehr viel früheren Abendpeak.

Doch inwieweit dienen diese Ergebnisse zur Charakterisierung des Rh7 knock-out Phänotyps als Schwachlichtrezeptor?

Die Phasenbeziehung zwischen Morgen- und Abendpeak im Vergleich der beiden getesteten Fliegenstämme wird unabhängig vom Lichtprogramm kaum verändert, wie schon erwähnt reagieren beide Stämme ähnlich auf die Lichtprogramme. Es zeigt sich jedoch ein weiterer Effekt von RH7: In den knock-out Fliegen treten die Morgenpeaks wie auch die Abendpeaks früher als in der Revertante auf (Abb. 29). Da dies auch in allen untersuchten Lichtprogrammen auftritt, könnte eine mögliche Rolle von RH7 in der Modulation der Synchronisation der Morgen- und Abendszillatoren, die für die Generierung der Abend- und Morgenaktivität gemäß dem 2-Oszillatoren-Modell von Pittendrigh und Daan (1976) verantwortlich sind, liegen. Dieses Modell wurde ausführlich im ersten Teil dieser Dissertation beschrieben. Die Geschwindigkeit der beiden Oszillatoren erscheint nicht verändert, die miteinander vergleichbaren Periodenlängen belegen dies. Besonders die im folgenden Abschnitt erwähnten Rotlichtexperimente zeigen, dass vor allem der M-Peak verfrüht wird. Der E-Peak könnte durch Kopplung passiv folgen.

In Arbeiten von Emery et al., (2000b) und Helfrich-Förster et al., (2001) wurde bereits spekuliert, dass die Komplexaugen vor allem auf den M-Peak wirken. Eventuell wird diese Wirkung durch RH7 vermittelt. Diese Effekte treten, wie erwähnt, besonders im Rotlicht auf. Im folgenden Kapitel wird die Rolle von RH7 in der Rotlichtrezeption diskutiert.

#### 4.3.2. Die Funktion von RH7 in der Rotlichtsensorik

Wie einleitend erwähnt, sollte durch Durchführung zweier unterschiedlicher Experimente analysiert werden, ob der Photorezeptor RH7 eine wichtige Rolle in der Rotlichtsensorik von *D. melanogaster* erfüllt, da Spektralanalysen von Wildtypstämmen und Photorezeptormutanten auf das Vorhandensein eines bisher unbekannten Rotlichtrezeptors hinweisen (Helfrich-Förster et al., 2001).

Zunächst sollen die Ergebnisse des Rotlicht-Shiftexperiments analysiert werden.

Es wurde nach 6 Tagen RD ein durch Wechsel des Lichtprogramms um 6 Stunden verspätet auftretender RD-Zyklus verabreicht, um die Synchronisierbarkeit der Fliegen zum neu verabreichten RD-Zyklus als Maß für die Rolle des Photorezeptor RH7 in der Rotlichtsensorik und dessen Einfluss in der circadianen Rhythmik beurteilen zu können. Die gleichartig konzipierten Einzelexperimente wurden mit Rotlichtintensitäten von  $0,02\mu\text{W}/\text{cm}^2$ ,  $0,04\mu\text{W}/\text{cm}^2$  und  $0,08\mu\text{W}/\text{cm}^2$  durchgeführt, um auch eine Abhängigkeit des Resynchronisationsvermögens von der Rotlichtdosis analysieren zu können. In den RD Durchschnittstagen zeigt sich ein signifikanter, von der Rotlichtdosis abhängiger Effekt von RH7: Der Morgenpeak war in der knock-out Mutante bei der geringsten Rotlichtintensität deutlich früher als bei der Kontrolle, verschob sich aber mit zunehmender Rotlichtintensität zum Licht-an Peak, bis auch dieser– wie bei der Wildtyplinie *yw;+;+–* bei einer Dosis von  $0,08\mu\text{W}/\text{cm}^2$  mit dem Licht-an Peak verschmilzt (Abb. 31). Die Aktivitätsmenge und die Verteilung der Aktivität (Anteil der Tag- und Nachtaktivität) sind kaum unterschiedlich (Abb. 31 und Abb. 35). Ein Effekt von RH7 ist in der erheblichen Veränderung des Verhaltensmusters erkennbar, wenn dieses Protein unter der Kontrolle des *Rh1*-Promotors in den transgenen Stämmen *yw;Rh1-Rh7;+* und *yw;Rh1-Rh7;ninaE* exprimiert wird. In beiden Stämmen zeigt sich eine deutliche Steigerung des Aktivitätsspiegels, die Aktivität in der Nacht nimmt zu, und ein ausgeprägter Morgen- wie Abendpeak sind erkennbar (Abb. 31, 32 und Abb. 35). Besonders sei auf den sehr frühen Morgenpeak hingewiesen, der in der Nacht weit vor dem Licht-an Peak auftritt. Die Phasenbeziehung zwischen Morgen- und Abendpeak ist im Vergleich zum Wildtyp aber auch zur *Rh7* knock-out Mutante stark vergrößert (Abb. 31 und Abb.32). Des Weiteren soll der Effekt von RH7 im Resynchronisationsverhalten diskutiert werden. Im Vergleich des Wildtyps mit der knock-out Mutante lassen sich keine gravierenden Unterschiede im Resynchronisationsverhalten feststellen. In einem Zeitraum von 15 Tagen können zumindest bei einer Rotlichtintensität von  $0,08\mu\text{W}/\text{cm}^2$  alle getesteten *Rh7* knock-out Fliegen in einer mit dem Wildtyp vergleichbaren Zeitspanne ihren Rhythmus mit dem neuen RD synchronisieren (Abb. 32, 33 und Abb. 34). Auch im transgenen Stamm *yw;Rh1-Rh7;+* erscheint die Resynchronisationsfähigkeit zum verspäteten RD in einem Zeitraum von 15 Tagen gegeben zu sein (Abb. 32, 33 und Abb. 34). Der Photorezeptor RH7 vermittelt jedoch einen erheblichen Effekt, der im Vergleich der Stämme *yw;Rh1-Rh7;ninaE* und *yw;+;ninaE* deutlich wird: Durch Expression von RH7 in *R1-6* können im Unterschied zu 0% der *yw;+;ninaE*-Fliegen durchschnittlich 78% der *yw;Rh1-Rh7;ninaE*-Fliegen zu einem RD synchronisiert werden, darüberhinaus können 33% der synchronisierten Fliegen bei einer Rotlichtintensität von  $0,08\mu\text{W}/\text{cm}^2$  in einem Zeitraum von 15 Tagen ihren Rhythmus zum verspäteten RD resynchronisieren (Abb. 32, 33 und Abb. 34).

Die Ergebnisse dieser Rotlichtexperimente weisen auf die Funktion des Photopigment RH7 in der Rotlichtsensorik hin. Dieser Effekt ist allerdings nur dann deutlich zu erkennen, wenn Rh1 fehlt und durch RH7 ersetzt wurde. Wenn man die Rh7 knock-out Mutante mit dem Wildtyp vergleicht, ist jedoch nur ein schwacher Effekt zu beobachten. Eine Erklärung hierfür könnte die vermutete, sehr geringe Expression des Photorezeptors im Wildtyp sein. Ein von RH7 vermittelter Effekt in der Rotlichtsensorik, könnte durch Signale, vermittelt durch die Rhodopsinen R1-6, die im Vergleich zu RH7 stark überrepräsentiert sein könnten, „maskiert“, also verdeckt werden. Gestützt wird diese Hypothese durch die hohe Effektivität von RH7 in der Rotlichtsensorik, die deutlich wird, wenn dieses Pigment anstelle von Rh1 in R1-6 exprimiert wird: 78% der *yw;Rh1-Rh7;ninaE*-Fliegen können im Vergleich zu keiner einzigen *yw;+;ninaE*-Fliege zu einem RD synchronisiert werden, und 33% der Fliegen können innerhalb 15 Tagen nach dem Shift des RD ihren Rhythmus erfolgreich an den verspäteten RD anpassen. Es muss jedoch erwähnt werden, dass dieser Effekt durch Analyse eines transgenen Stammes abgeleitet wurde, eine Aussage über die „normale“ Funktionsbasis von RH7 kann daher nur bedingt formuliert werden.

Im folgenden Abschnitt sollen die Ergebnisse des „Dauerrotlichtexperiments“ analysiert werden. Wildtyp *Canton S*-Fliegen sind unter RR-Bedingungen rhythmisch (persönliche Information von C. Wülbeck), jedoch arrhythmisch in Dauerweisslicht LL (Konopka et al., 1989; Emery et al., 2000a; Helfrich-Förster et al., 2001; Rieger et al., 2006). Diese Arrhythmizität der Wildtyp-Fliegen wird vermutlich durch den Blaulichtrezeptor Cryptochrom vermittelt, da Fliegen ohne Cryptochrom in LL rhythmisch sind (Helfrich-Förster et al., 2001; Rieger et al., 2006). Die Funktion von Cryptochrom kann jedoch durch Verwendung von Rotlicht umgangen werden, da der Blaulichtrezeptor Cryptochrom das langwellige Rotlicht nicht absorbiert. Es sollte erwähnt werden, dass LL, auch wenn Cryptochrom ausgeschlossen wurde, deutliche Effekte auf die Rhythmik hat, sofern intakte Komplexaugen vorhanden sind (Rieger et al., 2006). Periodenveränderung, sowie eine unterschiedliche Wirkung des Lichtes auf den M- und E-Oszillator, wie sie beim Splitting und bei der Internen Desynchronisation beobachtbar sind, konnten gezeigt werden (Rieger et al., 2006). Splitting bedeutet, dass nach Entkoppeln der kurz- und langperiodischen Aktivitätskomponenten diese Komponenten beim Zusammentreffen der Aktivitätsbänder miteinander verschmelzen, und in den Folgetagen der Freilauf dieser Hauptkomponente bei etwa 24h liegt. Interne Desynchronisation bedeutet, dass sich in RR, ausgehend von der Abendaktivität zwei Aktivitätskomponenten (Aktivitätsbänder), die mit einer kurzen und einer langen Periode im Freilauf sind, überkreuzen. Diese Effekte von LL sollten auch im RR beobachtbar sein, wenn der unbekannte Rotlichtrezeptor in den Komplexaugen vorhanden ist. Wenn dieser Rotlichtrezeptor RH7 wäre, so sollte es Unterschiede zwischen der knock-out Mutante und den Kontrollen im RR-Experiment geben.

Die Auswertung der Verhaltensdaten erwies sich als schwierig, da auch die Fliegen eines Genotyps in RR kein einheitliches Verhaltensmuster aufwiesen (Tab. 10 und Abb. 36). Es konnten jedoch trotzdem signifikante Unterschiede im Aktivitätsmuster im Vergleich des Wildtyps (*yw*;+;+) und der Rh7 knock-out Mutante festgestellt werden: Bei nahezu der Hälfte der registrierten Wildtypfliegen (45%) jedoch nur einem signifikant geringerem Anteil der Rh7 knock-out Fliegen (14%) kann Interne Desynchronisation festgestellt werden (*Chi*<sup>2</sup>-Test: *p*= 0,027; *d(f)*= 3) (Tab. 10 und Abb. 36). Der Photorezeptor RH7 könnte das Entkoppeln der Aktivitätskomponenten in RR beeinflussen: fehlt RH7, so wird die Entkopplung der Aktivitätskomponenten reduziert, da im größten Anteil (28%) der Rh7 knock-out Fliegen der Freilauf mit einer Periode von etwa 24h erkennbar ist, dies aber nur in 5% der Wildtyp-Fliegen auftritt. In beiden Stämmen ist in nahezu gleichen Anteilen der Fliegen (~40%) Splitting zu beobachten (Tab. 10 und Abb. 36).

Ein erheblicher Unterschied im Verhalten der transgenen Stämme *yw*;*Rh1-Rh7*;*ninaE* und *yw*;*Rh1-Rh7*;+ besteht darin, dass in nahezu der Hälfte (42%) der *yw*;*Rh1-Rh7*;*ninaE*-Fliegen in RR Freilauf bei einer Periodenlänge von etwa 24h beobachtbar ist, dies jedoch in keiner *yw*;*Rh1-Rh7*;+ Fliege auftritt (Tab. 10). Splitting ist in 66% der getesteten *yw*;*Rh1-Rh7*;+-Fliegen, aber nur 30% der *yw*;*Rh1-Rh7*;*ninaE*-Fliegen nachweisbar. Der *Chi*<sup>2</sup>-Test belegt signifikante Unterschiede zwischen den Stämmen *yw*;*Rh1-Rh7*;*ninaE* und *yw*;*Rh1-Rh7*;+ (*p*= 0,002; *d(f)*= 3). Es konnten nur wenige Tiere des Stammes *yw*;+;*ninaE* registriert werden, die jedoch arrhythmisch in RR waren. Eine Funktion des Photopigments RH7 in der Rotlichtsensorik wird auch in diesem Experiment deutlich, wenn dieses Pigment anstelle von Rh1 in R1-6 exprimiert wird: 90% der *yw*;*Rh1-Rh7*;*ninaE*-Fliegen sind in RR rhythmisch, hingegen ist keine Fliege des Stammes *yw*;+;*ninaE* rhythmisch (Tab. 10).

Die beiden Rotlichtexperimente lassen erkennen, dass RH7 ein rotlichtsensitiver Photorezeptor in *D. melanogaster* ist. Es erscheint jedoch schwierig die Rolle von RH7 eindeutig zu beschreiben, da, möglicherweise bedingt durch die vermutete, sehr geringe Expressionsrate des Proteins, ein Signal, vermittelt durch RH7, durch die Funktion der höher repräsentierten Rhodopsine 1-6 verdeckt wird, und damit nur eine untergeordnete Rolle spielen könnte. Eine mögliche Unterstützung für diese Spekulation besteht in den gravierenden Unterschieden, die durch „Überexpression“ von RH7 in R1-6 anstelle von Rh1 im Stamm *yw*;*Rh1-Rh7*;*ninaE* hervorgerufen werden: Wie durch Analyse beider Rotlichtexperimente ersichtlich wird, generiert RH7 die Synchronisation von einem großen Anteil von Rh1-Mutanten zu RD bzw. RL-Zyklen und verhindert Arrhythmizität in RR (siehe Abb. 32, 33, 34 und 36; Tab. 10).

Wie beeinflusst schwaches Rotlicht die circadiane Rhythmik in anderen Organismen?

Die Veränderung des Melatoninspiegels wird als ein maßgebender Faktor zur Kontrolle circadianer Effekte von Lichtstimuli in Fischen und Säugern beschrieben (Oliveira et al., 2007).

So wird die Verwendung von Rotlicht zur Arbeit in der Nacht empfohlen, da rotes Licht die Produktion von Melatonin z.B. von Senegal-Flundern (*Solea seleganensis*) in der Nacht nicht beeinflusst und somit deutliche Auswirkungen von rotem Licht auf die Innere Uhr ausgeschlossen werden (Slotten et al., 2005; Oliveira et al., 2007). Eine durchaus übliche Behandlung, um Säuger vor einem Experiment im Freilauf zu halten, ist das Halten der Tiere in einem angeblichen „DD“, jedoch mit schwachem Rotlicht im Hintergrund. Effekte auf die circadiane Rhythmik bedingt durch den Rotlichteinfluss z.B. bei Nagern wie der Nilgrasratte (*Arvicanthis ansorgei*) werden nicht angenommen (Slotten et al., 2005). Bei Vögeln, speziell den Zugvögeln sind jedoch erhebliche photoperiodischer Effekt z.B. auf die Zugunruhe der Kappenammer (*Emberiza melanocephala*) ausgelöst durch Experimente mit Blau- und Rotlichtphasen nachgewiesen worden (Malik et al., 2004). Eine entscheidende Bedeutung in der Auslösung der Zugunruhe wird dabei dem Anteil von Rotlicht zugesprochen (Malik et al., 2004). Detaillierte Hinweise über circadiane Effekte von Rotlicht in der Taufliege *D. melanogaster* liegen nicht vor, lediglich ein möglicher Effekt von Rotlicht als Entrainment-Stimulus in RD-Zyklen wurde diskutiert (Zordan et al., 2001).

Die Ergebnisse der Rotlichtexperimente belegen eine Funktion von RH7 in der Rotlichtsensorik. Es kann angenommen werden, dass nicht nur in Vögeln photoperiodische Effekte durch Rotlicht ausgelöst werden, sondern in Säugern wie auch Fliegen Rotlicht durchaus nicht unerhebliche Effekte auf die circadiane Rhythmik auslösen kann.

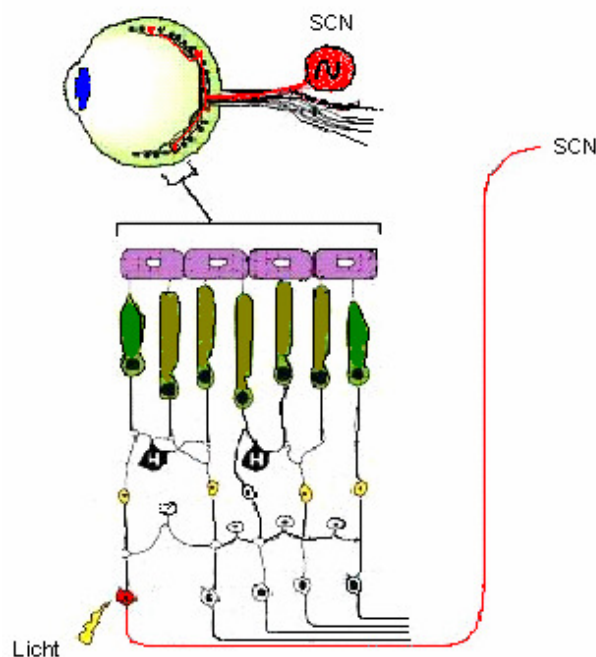
#### **4.4. Ist RH7 ein Melanopsin-ähnlicher Photorezeptor in *D. melanogaster*?**

Das Protein RH7 erhielt die Bezeichnung „Rhodopsin“ aufgrund hoher Sequenzhomologie zu den bekannten *Drosophila*-Rhodopsinen. Es wurde z.B. 30,5% Homologie mit Rh5 und 25% Homologie mit RH6 nachgewiesen (Veleri, Dissertation 2005). Darüberhinaus deutet die Architektur des Proteins auf das Vorhandensein von 7 Transmembrandomänen (TMD) hin, ein Charakteristikum für G-Protein gekoppelte Rhodopsine. Aufgrund dieser Eigenschaften wurde RH7 der „Superfamilie“ der G-Protein gekoppelten Rhodopsine zugeordnet (Flybase).

Interessanterweise jedoch weist RH7 mehr Ähnlichkeit mit einer Retinal-Isomerase (Retinochrom) des Tintenfisches auf als mit den Rhodopsinen (Hara-Nishimura et al., 1990). Weitere Zweifel, ob es sich bei RH7 um ein „typisches“ Invertebraten-Rhodopsin handeln könnte entstanden, nachdem beschrieben wurde, dass bei Sequenzanalysen ein in der dritten cytoplasmatischen Schleife bei Rhodopsinen der Invertebraten konserviertes His-Glu-Lys-Motiv, das für die Bindung des G-Proteins und damit eine mögliche Signalwirkung wichtig ist, in RH7 nicht existiert (Franke et al., 1992; Gärtner und Towner, 1995; Gärtner, 2000). Die

Sequenzvergleiche sind übersichtlich in der Dissertation von S. Veleri (2005) dargestellt. Die Absenz des His-Glu-Lys-Motivs, sowie das Fehlen der C-terminalen Region des Proteins (wichtig für die Arrestinbindung und damit Deaktivierung aktivierten Rhodopsins) fehlt auch in Retinotrom, daher wird dieser Isomerase nur eine katalytische Rolle zugesprochen, eine signalisierende Funktion jedoch ausgeschlossen (Spudich et al., 2000). Die Sequenz von Rh7 weist auf eine Arrestinbindestelle im C-terminalen Ende auf, und eine Signalwirkung kann sehr wohl festgestellt werden, wie in dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte. Aufgrund hoher Sequenzhomologie und durch Bestätigung der photosensorischen Funktion sind erstaunliche Parallelen mit einem circadianen Photorezeptor der Säuger feststellbar, der seit dessen Entdeckung (Provencio et al., 2000) hohe Aufmerksamkeit erlangte und seit etwa einem Jahrzehnt Mittelpunkt akribischer Forschung ist: Melanopsin (Opn-4). Melanopsin vermittelt eine Signalwirkung trotz fehlen des His-Glu-Lys-Motivs, es stellt sich daher die Frage, ob RH7 ein Melanopsin-ähnlicher Photorezeptor in *D. melanogaster* sein könnte.

Melanopsin ist ein Photorezeptor der Vertebraten, der in einer Untergruppe retinaler Ganglienzellen (RGC) exprimiert wird und unabhängig von den Signalen der Stäbchen und Zapfen die circadiane Rhythmik der Säuger synchronisiert (siehe Abb. 37) (Panda et al., 2005; Fu et al., 2005; Sekaran et al., 2005; Hattar, 2006; Peirson und Foster, 2006; Mure, 2007, Berson et al., 2007; Wang und Montell, 2007).



**Abb. 37: Schematischer Ausschnitt aus einem Teil der Vertebraten-Retina**

Der circadiane Photorezeptor Melanopsin ist nur in 1-3% der RGC's exprimiert und sendet nach Aktivierung durch Licht Signale zum SCN.

Melanopsin wird jedoch interessanterweise auch eine Funktion als Photoisomerase zugesprochen, da das Pigment alternativ 11-*cis*- oder all-*trans*-Retinal binden kann (Melyan et al., 2005; Panda et al., 2005; Fu et al., 2005; Peirson und Foster, 2006; Berson, 2007). Die „bireaktive“ Fähigkeit, einerseits als Photorezeptor zu wirken und andererseits wiederholt die Isomerisierung zwischen den Stereoformen des Retinals katalysieren zu können, konnte mittlerweile auch *in vivo* bestätigt werden (Mure et al., 2007), hat es doch lange nur als Fähigkeit der Rhodopsine von Arthropoden und des Tintenfisches gegolten (Koyanagi et al., 2005). Bemerkenswerterweise deuten Stammbaumanalysen basierend auf Sequenzdaten von Zellen der Ganglienschicht wie Amakrinzellen, Horizontalzellen und RGC's auf einen rhabdomeren Ursprung von Melanopsin hin und nicht auf einen gemeinsamen ciliären Ursprung mit den Stäbchen und Zapfen der Retina (Arendt, 2003, Arendt et al., 2004, Nickle und Robinson, 2007, Wang und Montell, 2007). Tatsächlich konnte die Koexistenz ciliärer und rhabdomerer Photorezeptoren auch im Meeresborstenwurm *Platynereis* nachgewiesen werden (Arendt et al., 2004). Eine weitere Bestätigung für die Koexistenz rhabdomerer und ciliärer Photopigmente gelang in einem als evolutionärem Bindeglied angesehenen Cephalochordaten: *Branchiostoma belcheri* (Koyanagi et al., 2005). Höhere Sequenzhomologien mit Opsinen der Invertebraten als mit den Vertebraten unterstützen die Annahme, dass sich bei Melanopsin um ein Opsin rhabdomeren Ursprungs handelt (Fu et al., 2005; Koyanagi et al., 2005; Peirson und Foster, 2006; Berson, 2007). Wie mehrfach bestätigt, entspricht die von Melanopsin ausgelöste Signaltransduktionskaskade dem Mechanismus in den rhabdomeren Photopigmenten der Invertebraten. Die Aktivierung der Transduktionskaskade über G<sub>q</sub>-Proteine mit anschließender Stimulierung des Effektorproteins PhospholipaseC<sub>β</sub> (PLC<sub>β</sub>), endend in einer Depolarisation der Photorezeptormembran konnte mehrfach bestätigt werden (Isoldi et al., 2005; Melyan et al., 2005; Panda et al., 2005; Qiu et al., 2005; Peirson und Foster, 2006; Berson, 2007; Wang und Montell, 2007).

Doch welche Erkenntnisse lassen sich nun für den Photorezeptor RH7 ableiten?

Hypothetisch könnte es sich auch bei RH7 in *Drosophila* um ein bireaktives Protein handeln, das eine katalytische (Isomerase) und eine signalisierende Funktion (Photorezeptor) vereint. Die Vermutung, dass RH7 wie Melanopsin über die Aktivierung von G<sub>q</sub>-Proteinen mit anschließender Stimulierung des Effektorproteins PhospholipaseC<sub>β</sub> (PLC<sub>β</sub>) die Invertebraten-Transduktionskaskade auslöst, liegt nahe und wurde auch schon früher vermutet (Adams et al., 2000). Dies würde aber bedeuten, dass das angeblich für die Bindung des G-Proteins bedeutsame (Franke et al., 1992; Gärtner und Towner, 1995; Gärtner, 2000), bei Rhodopsinen der Invertebraten konservierte His-Glu-Lys-Motiv der dritten cytoplasmatischen Schleife, für eine mögliche Signalwirkung nicht existentiell wichtig ist, da Melanopsin- und vermutlich RH7- in der Lage wären trotz Fehlen dieses Motives die Invertebraten-Transduktionskaskade auszulösen!



Das Gen *norpA* codiert für die PLC $\beta$ , die wiederum eine essentielle Komponente der *Drosophila* Phototransduktionskaskade ist (Bloomquist et al., 1991; Schneuwly et al., 1991; McKay et al., 1995). Starke Allele des mutierten *norpA*-Gens (z.B. *norpA<sup>p41</sup>*) haben die Inaktivierung der Transduktionskaskade und dadurch dem Verlust der Signalwirkung zur Folge (Pak et al., 1970, Hotta und Benzer, 1970). In einem Experiment kann daher durch Insertion des mutierten *norpA<sup>p41</sup>*-Gens in den Stamm *yw;Rh1-Rh7;ninaE* kontrolliert werden, ob RH7 über die Invertebraten-Transduktionskaskade signalisiert. Falls dies zutrifft, sollte kein *ON*- und *OFF*-Signal im ERG der *norpA<sup>p41</sup>;Rh1-Rh7;ninaE*-Fliegen mehr zu finden sein.

Sollte dies zutreffen, dann wäre jedoch auszuschliessen, dass RH7 der noch nicht identifizierte Photorezeptor der *norpA<sup>p41</sup>, cry<sup>b</sup>*-Fliegen ist, der trotz Eliminierung der Signale der Rhodopsine 1-6 und Cryptochrom die Synchronisation molekularer Rhythmen in den DN der Fliegen zu LD-Zyklen gewährleistet (Stanewsky et al., 1998; Emery et al., 2000b; Helfrich-Förster et al., 2001, Veleri et al., 2003).

Doch könnte RH7 auch über noch völlig unbekannte Mechanismen ein intrazelluläres Signal vermitteln: Es sollte bedacht werden, dass das Dogma, das die 7 TMD-Rezeptoren selektiv durch Aktivierung von spezifischen heterotrimeren G-Proteinen Signalkaskaden auslösen, stark diskutiert wird (Hall et al., 1999; Filipek et al., 2003; Berson 2007). Dies würde bedeuten, dass nicht nur klassisch über G-Proteine, sondern auch z.B. durch direkte Aktivierung von Arrestinen, G-Protein gekoppelten Rezeptorkinasen (GRK), Polyprolinbindenden Proteinen (SH3), kleinen GTP-bindenden Proteinen (g) eine Vielzahl von bisher noch unbekannten intrazellulären Signalwegen existieren könnten (Hall et al., 1999). Diese Spekulation erscheint durchaus plausibel, da auch bei der Ermittlung der von Melanopsin aktivierten Transduktionskaskade die Effektivität des Einsatzes von Pharmaka zur Blockade von Komponenten des Signaltransduktionswegs als kaum wirksam einzuschätzen war (Peirson und Foster, 2006; Berson, 2007).

Es erscheint aus meiner Sicht plausibel, dass in Säugern wie in Fliegen noch bisher unbekannte bzw. unzureichend charakterisierte Pigmente existieren, da, obwohl ein Kerngebiet der Sinnesphysiologie in der Erforschung des Sehens in Säugern liegt, auch die Funktionen der Opsine Encephalopsin, Peropsin, RGR-Opisin und VA-Opisin noch fast völlig unbekannt sind (Bellingham et al., 2003; Terakita, 2005; Nickle und Robinson, 2007).

Es sei abschliessend noch auf eine weitere vermutete Gemeinsamkeit von RH7 und Melanopsin hingewiesen: Wie die Ergebnisse meiner Arbeit vermuten lassen, ist RH7 ein vermutlich schwach exprimiertes Protein. Auch das Expressionsniveau von Melanopsin ist sehr niedrig: In nur 1% der RGC's des Menschen und der Mäuse ist dieser circadiane Photorezeptor auffindbar (Berson et al., 2002, Foster, 2005).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Sequenz- und Funktionsanalyse von RH7 erstaunliche Parallelen mit dem Invertebraten-ähnlichen circadianen Photorezeptor der Säuger, Melanopsin, aufzeigt. Dieses sog. bireaktive Pigment erfüllt eine signalisierende und katalytische Funktion, Eigenschaften die eventuell auch RH7 erfüllen könnte. Experimente mit einer blockierten Invertebraten-Phototransduktionskaskade könnten Aufschluß über den von RH7 aktivierten Signalweg geben.

#### 4.5. Ausblick

Durch die in dieser Arbeit erworbene Erkenntnis, dass das Proteins RH7 ein Photorezeptor in *D. melanogaster* ist, eröffnet sich eine breite Basis für weitergehende Untersuchungen des Themas: Eine Vielzahl molekularbiologischer, histologischer, genetischer und verhaltensbiologischer Untersuchungen wird vonnöten sein, um Lokalisationsort, Expressionsniveau, physiologische Funktionalität und Signalwirkung des Pigments charakterisieren zu können. Eine große Hilfe könnten die bereits in dieser Arbeit etablierten transgenen Linien sowie die Rh7 knock-out Mutante darstellen.

Zunächst sollte jedoch die Herstellung eines RH7-spezifischen Antikörpers forciert werden, um Einblick in das Expressionsmuster von RH7 zu erhalten, um so auch die Frage zu diskutieren, ob es sich bei RH7 wirklich um den unbekannten Photorezeptor der Dorsalen Neurone in *D. melanogaster* handelt. Parallel dazu könnten die spektralen Eigenschaften des Pigments durch Ableitung von ERG's unter Einsatz monochromatischer Lichtsignale charakterisiert werden. Die Expression von RH7 in heterologen Expressionssystemen (z.B. in Oocyten von *Xenopus*) zur Analyse der Funktionalität des Pigments erscheint empfehlenswert, da auch zur Aufklärung der Funktion und physiologischen Wirkung von Melanopsin die Anwendung dieser Methodik entscheidenden Beitrag geleistet hat (Melyan et al., 2005; Panda et al., 2005; Qiu et al., 2005; Peirson und Foster, 2006).

## 5. Zusammenfassung

Dieser Teil der Dissertation befasste sich mit der Funktions- und Expressionsanalyse eines bisher nicht charakterisierten Proteins in *D. melanogaster*. Dieses Protein wurde aufgrund hoher Sequenzhomologien mit den bekannten Rhodopsinen 1-6 der Taufliege RH7 genannt und der Photorezeptorklasse der Rhodopsine zugeordnet (Adams et al., 2000). Das Expressionsmuster von RH7 im Wildtyp konnte in dieser Arbeit nicht eindeutig bestimmt werden. Einerseits waren Ergebnisse nicht konsistent, die durch Überprüfung von *UAS-GFP* Linien (*UAS-(Rh7)*-Konstrukte von S. Veleri, 2004) ermittelt wurden, zum anderen bedürfen die Vermutungen über den möglichen Expressionsort des Proteins, die durch Signale des verwendeten Antikörpers (von J. Bentre, Karlsruhe) ermittelt wurden, und eine Expression von RH7 in den Komplexaugen und Ocellen vermuten lassen, einer Verifizierung.

Um die Rolle von RH7 in der Photosensorik von *Drosophila* auch *in vivo* überprüfen zu können, wurden in dieser Arbeit Überexpressionslinien etabliert und eine Rh7 knock-out Mutante hergestellt.

Im Rahmen dieses Teils der Dissertation gelang die Identifikation eines neuen Photorezeptors in *D. melanogaster*. Durch Ableitung von ERG's konnte erstmalig die Funktion von RH7 in der Photosensorik bewiesen werden. Darüberhinaus bezeugen histologische Nachweise, dass RH7 in R1-6 im Rh1 knock-out Hintergrund (*yw;Rh1-Rh7;ninaE*-Fliegen) fähig ist, eine wildtypische Rhabdomerstabilität in R1-6 zu generieren, was wiederum als Beleg für die Identität von RH7 als funktionelles *Drosophila*-Rhodopsin gilt (Chou et al., 1996, Salcedo et al., 1999). Die Analyse des circadianen Lokomotorverhaltens, getestet in unterschiedlichen Experimentansätzen, demonstriert, dass RH7 einen Einfluss auf die circadiane Rhythmik der Taufliegen hat. Im Vergleich des Verhaltens wildtypischer Fliegen mit Rh7 knock-out Fliegen und Fliegen der transgenen Stämme konnten signifikante Unterschiede in der Schwachlichtrezeption (Weisslicht) verzeichnet werden. Des Weiteren zeigte sich, dass auch in der Fähigkeit der Rotlichtsensorik deutliche Unterschiede, die im Vergleich der Aktivitätsprofile der Stämme ersichtlich wurden, zu verzeichnen waren.

Abschliessend sei darauf hingewiesen, dass Sequenzanalysen eine hohe Sequenzidentität mit einem derzeit populären Gegenstand der Forschung, dem „bireaktiven“ Protein Melanopsin, bestätigen. Melanopsin fungiert nicht nur als circadianer Photorezeptor der Säuger sondern erfüllt auch eine katalytische Funktion als Retinalisomerase (Peirson und Foster, 2006). Die Ergebnisse dieser Arbeit bieten eine breite Basis für weitergehende Untersuchungen der genauen Funktion bzw. des Expressionsmusters von RH7. Darüberhinaus ist auch die Frage zu klären, ob es sich

aufgrund der Gemeinsamkeiten von RH7 und Melanopsin bei RH7 nicht um einen Melanopsin-ähnlichen, „bireaktiven“ Photorezeptor handelt.

#### **IV. Abbildungsverzeichnis**

- Abb. 1: Frontalansicht eines Kopfes von *D. melanogaster* mit schematisierter Lage der Photorezeptoren.
- Abb. 2: Aufbau des Komplexauges und der Ommatidien von *D. melanogaster*.
- Abb. 3: Schematische Darstellung eines Rhodopsin-Moleküls.
- Abb. 4: Vereinfachtes Modell des molekularen, circadianen Oszillators von *D. melanogaster*.
- Abb. 5: Schematisierte anatomische Lage der Uhrneuronen im Gehirn von *D. melanogaster*
- Abb. 6: Schematisierte Grafik des Lichtprogramms
- Abb. 7: Verhaltensmuster von Wildtyp-(*Canton S*)-Fliegen unter LD-, LM-, MM- und DD-Zyklen
- Abb. 8: Aktogramme und Durchschnittstage der Photorezeptormutanten *cry<sup>b</sup>* und *cli<sup>eya</sup>*
- Abb. 9: Unveränderter Rhythmus der PER- und TIM Proteinexpression im Vergleich von LD- und LM-Bedingungen
- Abb. 10: Nächtliches Mondlicht induziert Phasenverschiebungen der Uhrprotein-Expression in den Hauptschrittmacherzellen von *D. melanogaster*.
- Abb. 11: Quantifizierung der Färbeintensitäten der PER- und TIM-Antikörperfärbung im Zeitverlauf eines Tages im Vergleich von LD- und LM-Bedingungen.
- Abb. 12: Die durch Mondlicht in der Nacht bedingte Verschiebung der Proteinpeaks korreliert mit den Veränderungen der Aktivitätsmuster
- Abb. 13: Schema des Gens CG5638 (*rh7*) (Flybase) und Modell einer 3D-Struktur eines Rhodopsins
- Abb. 14: Illustration der spektralen Empfindlichkeit der Rhodopsine und von Cryptochrom (Nomogramme); Aktionsspektrum von Wildtyp *Canton S*-Fliegen
- Abb. 15: Graphische Darstellung der Rh1-Rh7 Klonierungskassette mit Angabe der Schnittstellen
- Abb. 16: Schema, das die Lage des *P-Elements* im *rh7*-Gen (Stamm: BL 21406) darstellt.
- Abb. 17: Detektion des RH7 Proteins in Fliegenköpfen durch Western Blot Analyse
- Abb. 18: Schema des *rh7*-Gens mit Anzeige des *P-Element* Insertionsortes; Schema des Gens CG9760
- Abb. 19: PCR-Experimente zur Überprüfung der Transkriptionsrate des *rh7*-Gens
- Abb. 20: Expressionsmuster von GFP in *Drosophila*-Ganzhirnpräparaten getrieben unter der Kontrolle verschiedener Rh7-GAL4 Linien.
- Abb. 21: Antikörperfärbung (Rh7:E) an wholemount-Gehirnpräparaten (a-c) und Gefrierschnitten (d,e) von *yw*-Fliegen.

- Abb. 22: Signalstärke der Antikörperfärbung (Rh7:E):**
- Abb. 23: Signalstärke der Antikörperfärbung in R1-6 und R7-8 in Gefrierschnitten**
- Abb. 24: 2µm-Tangentialschnitte von Retina-Semidünnpräparaten adulter *D. melanogaster*.**
- Abb. 25: Quantifizierung der Vakuolisierung der Retina adulter Taufliegen**
- Abb. 26: Modell, das das Erstellen der ersten Ableitung aus einem ERG erklärt.**
- Abb. 27: ERG's der ersten Ableitung des Rezeptorpotentials von *D. melanogaster***
- Abb. 28: Durchschnittstage der wildtypischen Fliegen der Linie 13 und der Rh7 knock-out Mutante im „Dämmerungsexperiment“**
- Abb. 29: Genaue Bestimmung der Lage der Aktivitätspeaks im „Rampenexperiment“**
- Abb. 30: Aktogramm einer *yw;+;ninaE*-Fliege**
- Abb. 31: RD-Durchschnittstage der getesteten transgenen Linien, Wildtyp-Stämme und der knock-out Mutante**
- Abb. 32: Einzelaktogramme der getesteten transgenen Linien, Wildtyp-Stämme und der Rh7 knock-out Mutante im RD Shiftexperiment bei 0,08µW/cm<sup>2</sup> Rotlicht**
- Abb. 33: Anteil der Fliegen eines Stammes, die in einer Zeit von bis zu 15 Tagen nach dem Shift ihre Aktivität mit dem RD resynchronisieren konnten**
- Abb. 34: Benötigte Zeit, die zur stabilen Resynchronisation auf den geshifteten RD in einem Zeitraum von 15 Tagen benötigt war.**
- Abb. 35: Vergleich der Aktivitätsmengen der Fliegen in RD-Zyklen**
- Abb. 36: Beispielaktogramme (Doppelplot), die die Verhaltensgrundmuster der getesteten Stämme im RR-Experiment widerspiegeln**
- Abb. 37: Schematischer Ausschnitt aus einem Teil der Vertebraten-Retina**

## ***V. Tabellenverzeichnis***

**Tab.1:** Auflistung der verwendeten primären Antikörper.

**Tab.2:** Auflistung der verwendeten fluoreszenten, sekundären Antikörper.

**Tab. 3:** Die Genotypen der wichtigsten in dieser Arbeit verwendeten Fliegenstämme.

**Tab. 4:** Oligonukleotide, die für die PCR und Sequenzreaktionen verwendet wurden

**Tab. 5:** In diesem Teil der Arbeit verwendete Antikörper

**Tab. 6:** Standardreaktionsansatz (Endvolumen 25µl) und Programm der Reaktionszyklen

**Tab. 7:** Die Komponenten der Sequenzierungsreaktion

**Tab. 8:** Lichtprogramm des „Rampenexperiments“

**Tab. 9:** GFP-Expressionsmuster verschiedener Rh7-GAL 4/UAS –GFP Linien.

**Tab. 10:** Einteilung erkennbarer Verhaltensgrundmuster im RR-Experiment

## VI. Glossar

Aa: von (engl. **amino acids**): Aminosäuren  
 CLK: Clock  
 CYC: Cycle  
 CRY: Cytochrom  
 ZT: Zeitgeber Zeit  
 CT: circadiane Zeit  
 LD: Licht-Dunkel Wechsel  
 DD: Dauerdunkel  
 LL: Dauerlicht  
 DD: Dauerdunkel  
 DRLR: Dunkel/Rampe/Licht/Rampe  
 MRLR: Mondlicht/Rampe/Licht/Rampe  
 R: „Rampe“: 0-100Lux Lichtintensität, logarithmisch zu/abnehmend; Dauer d. Rampenphase: 1,5 Stunden  
 LMR: Licht-Mondlicht-Rampe  
 LM: Licht-Mondlicht Wechsel  
 MM: Dauermondlicht  
 R1–R6: Rezeptorzelle 1 bis 6 der Komplexaugen  
 R7, R8: Rezeptorzelle 7 und 8 der Komplexaugen  
 Rh: Rhodopsin  
 l-LNV: große ventrale laterale Neuronen  
 s-LNV: PDF- positive kleine ventrale laterale Neuronen  
 5. s-LNV: PDF-negatives kleines ventrales laterales Neuron  
 LN<sub>d</sub>: dorsale laterale Neuronen  
 DN1a: anteriore dorsale Neurone1  
 DN1p: posteriore dorsale Neurone1  
 DN2: dorsale Neurone2  
 DN3: dorsale Neurone3  
 PDF: „pigment dispersing factor“ Homolog von PDH in der Fliege.  
 GFP: grün fluoreszierendes Protein  
 NGS: „normal goat serum“; Serum aus Ziegenblut  
 TrX: Triton X (Detergens)  
 LPN: laterale posteriore Neurone  
 SEM: „*standard error of the mean*“ = Vertrauensbereich des Mittelwertes  
 T: Freilaufperiode eines circadianen Systems  
 TIM: TIMELESS  
 UTR: nicht-translatierte Region einer RNA  
 WT: Wildtyp  
 ZT: „*zeitgeber time*“= Zeitgeberzeit  
 Kb: kilo-Basen-Paare (Längenangabe für DNA)  
 kDa: kilo-Dalton (Massenangabe bei großen Molekülen)  
 mRNA: „*messenger RNA*“, Boten-RNA  
 n: „numera“=Anzahl  
 ORF: offener Leserahmen eines Gens („*open reading frame*“)  
 PAGE: Polyacrylamid-Gelelektrophorese  
 PCR: Polymerase-Kettenreaktion  
 PER: PERIOD  
 PLC<sub>β</sub>: PhospholipaseC<sub>β</sub>  
 RNA: Ribonukleinsäure  
 BSA: Rinderserumalbumin (Protein)



cDNA: zur m-RNA komplementäre DNA („*copy*“ oder „*complementary*“)  
EMS: Ethylmethansulfonat  
et al.: „*et altera*“ = und andere  
EtOH: Ethanol  
EMS: Ethylmethansulfonat  
EtBr: Ethidiumbromid  
gDNA: genomische DNA  
Rh1-Rh7-Konstrukt: Konstrukt aus:Rh1-Minimalpromotor, Rh7 coding sequence und Rh1 3'UTR  
ERG: Elektroretinogramm  
TMD: Transmembrandomänen  
RGC: Retinale Ganglion Zellen  
YC4: P-Elementvektor (Yellow Carnegie Vektor)

## VII. Literaturverzeichnis

- Acharya, U., Mowen, M. B., Nagashima, K., and Acharya, J. K. (2004). Ceramidase expression facilitates membrane turnover and endocytosis of rhodopsin in photoreceptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 1922-1926.
- Adams, M. D. et al., (2000). The genome of *Drosophila melanogaster*. *Science* 24, 287(5461): 2185-95.
- Ahmad, S. T., Natochin, M., Artemyev, N. O., and O'Tousa, J. E. (2007). The *Drosophila* rhodopsin cytoplasmic tail domain is required for maintenance of rhabdomere structure. *Faseb J* 21, 449-455.
- Allada R., White N.E., So W.V., Hall J.C., and Rosbash, M. (1998) A mutant *Drosophila* homolog of mammalian Clock disrupts circadian rhythms and transcription of period and timeless. *Cell* 93: 791-804.
- Arendt, D., Tessmar-Raible, K., Snyman, H., Dorresteyn, A. W., and Wittbrodt, J. (2004). Ciliary photoreceptors with a vertebrate-type opsin in an invertebrate brain. *Science* 306, 869-871.
- Arendt, D. (2003). Evolution of eyes and photoreceptor cell types. *Int J Dev Biol* 47, 563-571.
- Arikawa, K., Mizuno, S., Kinoshita, M., and Stavenga, D. G. (2003). Coexpression of two visual pigments in a photoreceptor causes an abnormally broad spectral sensitivity in the eye of the butterfly *Papilio xuthus*. *J Neurosci* 23, 4527-4532.
- Aschoff J. (1958) Tierische Periodik unter dem Einfluss von Zeitgebern. *Z.Tierpsychol.* Vol.15: 1-30,
- Aschoff J (1979) Circadian rhythms: Influences of internal and external factors on the period measured in constant conditions. *Z Tierpsychol* 49:225-249.
- Ausbel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K. (1996). *Current Protocols in Mol. Biol.* New York: John Wiley & Sons.
- Bachleitner W, Kempinger L, Wulbeck C, Rieger D, Helfrich-Forster C. (2007) Moonlight shifts the endogenous clock of *Drosophila melanogaster*. *PNAS* 104(9):3538-43.
- Bellen, H. J., Levis, R. W., Liao, G., He, Y., Carlson, J. W., Tsang, G., Evans-Holm, M., Hiesinger, P. R., Schulze, K. L., Rubin, G. M., et al. (2004). The BDGP gene disruption project: single transposon insertions associated with 40% of *Drosophila* genes. *Geneti Canton S* 167, 761-781.
- Bellingham, J., Chaurasia, S. S., Melyan, Z., Liu, C., Cameron, M. A., Tarttelin, E. E., Iuvone, P. M., Hankins, M. W., Tosini, G., and Lucas, R. J. (2006). Evolution of melanopsin photoreceptors: discovery and characterization of a new melanopsin in nonmammalian vertebrates. *PLoS Biol* 4, e254.

- Bellingham, J., Wells, D. J., and Foster, R. G. (2003). In silico characterisation and chromosomal localisation of human RRH (peropsin)--implications for opsin evolution. *BMC Genomics* 4, 3.
- Bentrop, J., Schwab, K., Pak, W. L., and Paulsen, R. (1997). Site-directed mutagenesis of highly conserved amino acids in the first cytoplasmic loop of *Drosophila* Rh1 opsin blocks rhodopsin synthesis in the nascent state. *Embo J* 16, 1600-1609.
- Berson, D. M. (2007). Phototransduction in ganglion-cell photoreceptors. *Pflugers Arch* 454, 849-855.
- Bichler, D. Der Einfluss von Tageslänge auf die Aktivitätsrhythmik von wildtypischen *Drosophila melanogaster* und Photorezeptormutanten. Diplomarbeit, Universität Regensburg, 2007
- Bloomquist, J. R., Grubs, R. E., Soderlund, D. M., and Knipple, D. C. (1991). Prolonged exposure to GABA activates GABA-gated chloride channels in the presence of channel-blocking convulsants. *Comp Biochem Physiol C* 99, 397-402.
- Brand, A.H. and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118: 401--415.
- Bonini, N. M., Leiserson, W. M., and Benzer, S. (1993). The eyes absent gene: genetic control of cell survival and differentiation in the developing *Drosophila* eye. *Cell* 72, 379-395.
- Bunning, E. (1969). Common features of photoperiodism in plants and animals. *Photochem Photobiol* 9, 219-228.
- Cashmore AR, Jarillo JA, Wu YJ, Liu D (1999) Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. *Science*. 284(5415):760-5
- Chang, D. C. (2006). Neural circuits underlying circadian behavior in *Drosophila melanogaster*. *Behav Processes* 71, 211-225.
- Chen, D. M., Christianson, J. S., Sapp, R. J., and Stark, W. S. (1992). Visual receptor cycle in normal and period mutant *Drosophila*: microspectrophotometry, electrophysiology, and ultrastructural morphometry. *Vis Neurosci* 9, 125-135.
- Ceriani MF, Darlington TK, Staknis D, Mas P, Petti AA, Weitz CJ, Kay S (1999) Light-Dependent Sequestration of TIMELESS by CRYPTOCHROME. *Science* 285:553-556.
- Chou, W. H., Hall, K. J., Wilson, D. B., Wideman, C. L., Townson, S. M., Chadwell, L. V., and Britt, S. G. (1996). Identification of a novel *Drosophila* opsin reveals specific patterning of the R7 and R8 photoreceptor cells. *Neuron* 17, 1101-1115.
- Cermakian, N., and Sassone-Corsi, P (2000) Multilevel regulation of the circadian clock. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 59-67.
- Cowman AF, Zuker CANTON S, Rubin GM.(1886) An opsin gene expressed in only one photoreceptor cell type of the *Drosophila* eye. *Cell*. 14;44(5):705-10.

Danilenko, K. V., Wirz-Justice, A., Krauchi, K., Weber, J. M., and Terman, M. (2000). The human circadian pacemaker can see by the dawn's early light. *J Biol Rhythms* 15, 437-446.

Emery P, So WV, Kaneko M, Hall JC and Rosbash M (1998) CRY, a *Drosophila* clock and light-regulated cryptochrome, is a major contributor to circadian rhythm resetting and photosensitivity. *Cell* 95:669-679.

Emery P, Stanewsky R, Hall JC and Rosbash M (2000a) A unique circadian rhythm photoreceptor. *Nature* 404:456-457.

Emery P, Stanewsky R, Helfrich-Förster C, Emery-Le M, Hall JC and Rosbash M (2000b) *Drosophila* CRY is a deep-brain circadian photoreceptor. *Neuron* 26:493-504.

Erkert HG. Der Einfluß des Mondlichtes auf die Aktivitätsperiodik nachtaktiver Säugetiere. *Oecologia (Berl.)* Vol. 14: 269-287, 1974

Erkert HG, Göber J. Direct modulation of activity and body temperature of owl monkeys (*Aotus lemurinus griseimembra*) by low light intensities. *Folia Primatol*, Vol. 47: 171-188, 1986

Erkert, H. G., and Cramer, B. (2006). Chronobiological background to cathemerality: circadian rhythms in *Eulemur fulvus albifrons* (Prosimii) and *Aotus azarai boliviensis* (Anthropoidea). *Folia Primatol (Basel)* 77, 87-103.

Evans, J. A., Elliott, J. A., and Gorman, M. R. (2007). Circadian effects of light no brighter than moonlight. *J Biol Rhythms* 22, 356-367.

Ewer J, Frisch B, Hamblen-Coyle MJ, Rosbash M, Hall JC. (1992) Expression of the period clock gene within different cell types in the brain of *Drosophila* adults and mosaic analysis of these cells' influence on circadian behavioural rhythms. *J Neurosci.* (9):3321-49.

Feiler R, Bjornson R, Kirschfeld K, Mismar D, Rubin GM, Smith DP, Socolich M, Zuker CANTON S (1992). Ectopic expression of ultraviolet-rhodopsins in the blue photoreceptor cells of *Drosophila*: visual physiology and photochemistry of transgenic animals. *J Neurosci* 12, 3862-3868

Feiler, R., Harris, W. A., Kirschfeld, K., Wehrhahn, C., and Zuker, C. S. (1988). Targeted misexpression of a *Drosophila* opsin gene leads to altered visual function. *Nature* 333, 737-741.

Fein, A., and Szuts E. (1982): Photoreceptors: Their role in vision, Cambridge, U.P., Cambridge, U.K.

Filipek, S., Stenkamp, R. E., Teller, D. C., and Palczewski, K. (2003). G protein-coupled receptor rhodopsin: a prospectus. *Annu Rev Physiol* 65, 851-879.

Foster, R. G. (2005). Neurobiology: bright blue times. *Nature* 433, 698-699.

Franke, R. R., Sakmar, T. P., Graham, R. M., Khorana, H. G. (1992). Structure and function in rhodopsin – studies of the interaction between the rhodopsin cytoplasmic domain and transducin. *J.B.C.* 267: 14767--14774.

Fraunholz C. Aufzeichnung der Laufspuren von adulten Taefliegen bei unterschiedlichen Helligkeiten und photophobes Verhalten von Larven. Diplomarbeit, Universität Regensburg, 2006

Frisch B, Hardin PE, Hamblen-Coyle MJ, Rosbash M, Hall JC. (1994) A promoterless period gene mediates behavioral rhythmicity and cyclical per expression in a restricted subset of the *Drosophila* nervous system. *Neuron*. (3):555-70

Fu, Y., Zhong, H., Wang, M. H., Luo, D. G., Liao, H. W., Maeda, H., Hattar, S., Frishman, L. J., and Yau, K. W. (2005). Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells detect light with a vitamin A-based photopigment, melanopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 10339-10344.

Gärtner, W. (2000). Invertebrate Visual Pigments. Chapter 7: In: Handbook of Biological Physi Canton S. Vol. 3 eds. Stavenga, D. G., DeGrip, W. J., Pugh Jr., E.N.

Gärtner, W., and Towner, P. (1995). Invertebrate visual pigments. *Photochem Photobiol* 62, 1-16.

Grima B, Lamouroux A, Chelot E, Papin C, Limbourg-Bouchon B and F Rouyer, 2002 The F-box protein Slimb controls the levels of clock proteins Period and Timeless. *Nature* 420: 178-182.

Grima B, Chélot E, Xia R, Rouyer F (2004) Morning and evening peaks of activity are controlled by different clock neurons of the *Drosophila* brain. *Nature* 431:869-873.

Glossop N.R., Houl J.H., Zheng H., Ng F.S., Dudek S.M., and Hardin P.E. (2003) VRILLE feeds back to control circadian transcription of Clock in the *Drosophila* circadian oscillator. *Neuron* 37, 249-261.

Gloor, G. B., Preston, C. R., Johanson--Schlitz, D. M., Nassif, N. A., Philis, R. W., Benz, W. K., Robertson, H. M., Engels, W. R. (1993). Type I repressors of P element mobility. *Geneti Canton S* 135: 81--95.

Gorman, M. R., Kendall, M., and Elliott, J. A. (2005). Scotopic illumination enhances entrainment of circadian rhythms to lengthening light:dark cycles. *J Biol Rhythms* 20, 38-48.

Gorman, M. R., and Elliott, J. A. (2004). Dim nocturnal illumination alters coupling of circadian pacemakers in Siberian hamsters, *Phodopus sungorus*. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 190, 631-639.

Gorman, M. R., Evans, J. A., and Elliott, J. A. (2006). Potent circadian effects of dim illumination at night in hamsters. *Chronobiol Int* 23, 245-250.

Hall, J. C. (2000). Cryptochromes: sensory reception, transduction, and clock functions subserving circadian systems. *Curr Opin Neurobiol* 10, 456-466.

Hall JC (2005) Systems approaches to biological rhythms in *Drosophila*. *Meth Enzymol* 393:161-185.

Hall T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.

Hall, R. A., Premont, R. T., Lefkowitz, R. J. (1999). Heptahelical receptor signalling: beyond the G protein paradigm. *J.C.B.* 145: 927--932.

Hara-Nishimura, I., Kondo, M., Nishimura, M., Hara, R., and Hara, T. (1993). Amino acid sequence surrounding the retinal-binding site in retinochrome of the squid, *Todarodes pacificus*. *FEBS Lett* 335, 94-98.

Hardie R. C., Raghu P. (2001). Visual transduction in *Drosophila*. *Nature* 413, 186-193.

Hardie R. C. (1985). Functional organization of the fly retina. *Progress in Sensory Physiology* 5. Autrum, H., Ottoson, H.D, Perl, E.R., Schmidt R.F., Shimazu, H., and Willis, W.D. (eds.). Springer Verlag, New York, 1-79.

Hardie R. C. (1996). INDO-1 measurements of absolute resting and light-induced  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in *Drosophila* photoreceptors. *J Neurosci* 16, 2924-2933.

Hamblen-Coyle M. J., Wheeler D. A., Rutila J. E., Rosbash M. and Hall J. C. (1992) Behavior of period-altered circadian rhythm mutants of *Drosophila* in light:dark cycles (Diptera: Drosophilidae). *J Insect Behav* 5:417-446.

Hattar, S., Kumar, M., Park, A., Tong, P., Tung, J., Yau, K. W., and Berson, D. M. (2006). Central projections of melanopsin-expressing retinal ganglion cells in the mouse. *J Comp Neurol* 497, 326-349.

Heldmaier G.; Neuweiler G.: Vergleichende Tierphysiologie. Band 1. Neuro-und Sinnesphysiologie. Springer, Berlin, 2003

Helfrich-Förster C (1995) The period clock gene is expressed in CNS neurons, which also produce a neuropeptide that reveals the projections of circadian pacemaker cells within the brain of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 612-616.

Helfrich-Förster C (2000) Differential control of morning and evening components in the activity rhythm of *Drosophila melanogaster* - sex specific differences suggest a different quality of activity. *J Biol Rhythms* 15:135-154.

Helfrich-Forster, C., Winter, C., Hofbauer, A., Hall, J. C., and Stanewsky, R. (2001). The circadian clock of fruit flies is blind after elimination of all known photoreceptors. *Neuron* 30, 249-261.

Helfrich-Forster, C. (2002). The circadian system of *Drosophila melanogaster* and its light input pathways. *Zoology (Jena)* 105, 297-312.

Helfrich-Förster, C. (2005) Neurobiology of the fruit fly's circadian clock. *Genes Brain Behav* 4:65-76.

Helfrich-Förster C., Shafer O.T., Wülbeck C., Grieshaber E, Rieger D and Taghert P. (2007) Development and morphology of the clock-gene-expressing Lateral Neurons of *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Neurol.* Jan 1;500(1):47- 70.

Heisenberg, M. (1971). Separation of receptor and lamina potentials in the electroretinogram of normal and mutant *Drosophila*. *J Exp Biol* 55, 85-100.

Huber, A., Schulz, S., Bontrop, J., Groell, C., Wolfrum, U., and Paulsen, R. (1997). Molecular cloning of *Drosophila* Rh6 rhodopsin: the visual pigment of a subset of R8 photoreceptor cells. *FEBS Lett* 406, 6-10.

Huber, A. (2000) Ein molekularer Signalkomplex als zentrale Organisationsstruktur der Phototransduktion, Habilitation, Universität Karlsruhe.

Hofbauer A and Buchner E (1989) Does *Drosophila* have seven eyes? *Naturwissenschaften* 76:335-336.

Hotta, Y., and Benzer, S. (1970). Genetic dissection of the *Drosophila* nervous system by means of mosaic Canton S. *Proc Natl Acad Sci U S A* 67, 1156-1163.

Isoldi, M. C., Rollag, M. D., Castrucci, A. M., and Provencio, I. (2005). Rhabdomeric phototransduction initiated by the vertebrate photopigment melanopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 1217-1221.

Kaneko M and Hall JC (2000) Neuroanatomy of cells expressing clock genes in *Drosophila*: transgenic manipulation of the period and timeless genes to mark the perikarya of circadian pacemaker neurons and their projections. *J Comp Neurol* 422:66-94.

Kempinger L. Der Einfluss von Mondlicht auf die Aktivitätsrhythmik von *Drosophila melanogaster* – Vergleich von Wildtyp und Uhrmutanten. Diplomarbeit, Universität Regensburg, 2006

Kim, E. Y., and Edery, I. (2006). Balance between DBT/CKIepsilon kinase and protein phosphatase activities regulate phosphorylation and stability of *Drosophila* CLOCK protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 6178-6183.

Kitamoto, J., Sakamoto, K., Ozaki, K., Mishina, Y., and Arikawa, K. (1998). Two visual pigments in a single photoreceptor cell: identification and histological localization of three mRNAs encoding visual pigment opsins in the retina of the butterfly *Papilio xuthus*. *J Exp Biol* 201, 1255-1261.

Konopka R. J., Benzer S. (1971). Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, Vol.68: 2112-2116.

Konopka, R. J., Pittendrigh, C., and Orr, D. (1989). Reciprocal behaviour associated with altered homeostasis and photosensitivity of *Drosophila* clock mutants. *J Neurogenet* 6, 1-10.

Koyanagi, M., Kubokawa, K., Tsukamoto, H., Shichida, Y., and Terakita, A. (2005). Cephalochordate melanopsin: evolutionary linkage between invertebrate visual cells and vertebrate photosensitive retinal ganglion cells. *Curr Biol* 15, 1065-1069.

Kumar J. P., Ready DF (1995). Rhodopsin plays an essential structural role in *Drosophila* photoreceptor development. *Development* 121, 4359-4370.

Kumar, J. P., Bowman, J., O'Tousa, J. E., and Ready, D. F. (1997). Rhodopsin replacement rescues photoreceptor structure during a critical developmental window. *Dev Biol* 188, 43-47.

- Kurada, P., and O'Tousa, J. E. (1995). Retinal degeneration caused by dominant rhodopsin mutations in *Drosophila*. *Neuron* 14, 571-579.
- Leonard, D. S., Bowman, V. D., Ready, D. F., and Pak, W. L. (1992). Degeneration of photoreceptors in rhodopsin mutants of *Drosophila*. *J Neurobiol* 23, 605-626.
- Levine, J.D., Funes, P., Dowse, H.B., and Hall, J.C. (2002a) Signal analysis of behavioural and molecular cycles. *BMC Neurosci.* 3, 1.
- Lim C, Chung BY, Pitman JL, McGill JJ, Pradhan S, Lee J, Keegan KP, Choe J and R Allada. (2007). clockwork orange Encodes a Transcriptional Repressor Important fo Circadian-Clock Amplitude in *Drosophila*. *Curr Biol* 17: 1082-1089.
- Lin J.M., Kilman V. L., Keegan K., Paddock B., Emery-Le M., Rosbash M., Allada R. (2002) A role for casein kinase 2 in the *Drosophila* circadian clock. *Nature* 420: 816–820.
- Lindsley, D. L. and Zimm, G. G. (1992). The genome of *Drosophila melanogaster*. Academic Press, San Diego.
- Malik, S., Rani, S., and Kumar, V. (2004). Wavelength dependency of light-induced effects on photoperiodic clock in the migratory blackheaded bunting (*Emberiza melanocephala*). *Chronobiol Int* 21, 367-384.
- Matsumoto A, Ukai-Tadenuma M, Yamada RG, Houli J, Uno KD, Kasukawa TK, Dauwalder B, Itho TQ, Takahashi K, Ueda R Hardin PE Tanimura T and HR Ueda. (2007). A functional genomic screen reveals clockwork orange as a transcriptional regulator in the *Drosophila* circadian clock. *Genes Dev* in Press.
- Martinek S., Inonog S., Manoukian A.S., and Young M.W. (2001) A role for the segment polarity gene shaggy / GSK3 in the *Drosophila* circadian clock. *Cell* 105: 769–779.
- Marrus SB, Zheng H, Rosbash M (1996) Effect of constant light and circadian entrainment of *perS* flies: evidence for light-mediated delay of the negative feedback loop in *Drosophila*. *EMBO J* 15:6877-6886.
- Majercak J, Sidote D, Hardin PE, Edery I (1999) How a circadian clock adapts to seasonal decreases in temperature and day length. *Neuron* 24:219-230.
- McKay, R. R., Chen, D. M., Miller, K., Kim, S., Stark, W. S., and Shortridge, R. D. (1995). Phospholipase C rescues visual defect in *norpA* mutant of *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem* 270, 13271-13276.
- Miyasako, Y., Umezaki, Y., and Tomioka, K. (2007). Separate sets of cerebral clock neurons are responsible for light and temperature entrainment of *Drosophila* circadian locomotor rhythms. *J Biol Rhythms* 22, 115-126.
- Melyan, Z., Tattelin, E. E., Bellingham, J., Lucas, R. J., and Hankins, M. W. (2005). Addition of human melanopsin renders mammalian cells photoresponsive. *Nature* 433, 741-745.
- Meyer, N (2005) Mechanismen der lichtabhängigen Translokation des Ionenkanals TRPL in den Photorezeptoren von *Drosophila melanogaster*. Dissertation, Universität Karlsruhe.



- Moore-Ede MC, Sulzman FM, Fuller CA. (1982). The clocks that time us. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Montell C (1999). Visual transduction in *Drosophila*. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15, 231-268.
- Montell C, and Rubin GM (1989). Molecular characterization of the *Drosophila* *trp* locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* 2, 1313-1323.
- Morante, J., and Desplan, C. (2004). Building a projection map for photoreceptor neurons in the *Drosophila* optic lobes. *Semin Cell Dev Biol* 15, 137-143.
- Mrosovsky N (1996) Locomotor activity and non-photic influences on circadian clocks. *Biol Rev* 71:343-372.
- Mrosovsky N (1999) Masking: History, definitions, and measurement. *Chronobiol Internat* 16:415-429.
- Mure, L. S., Rieux, C., Hattar, S., and Cooper, H. M. (2007). Melanopsin-dependent nonvisual responses: evidence for photopigment bistability in vivo. *J Biol Rhythms* 22, 411-424.
- Myers M. P., Wager-Smith K., Rothenfluh-Hilfiker A., Young M. W. (1996) Light--induced degradation of TIMELESS and entrainment of the *Drosophila* circadian clock. *Science* 271: 1736-1740.
- Nickle, B., and Robinson, P. R. (2007). The opsins of the vertebrate retina: insights from structural, biochemical, and evolutionary studies. *Cell Mol Life Sci*.
- Oliveira, C., Ortega, A., Lopez-Olmeda, J. F., Vera, L. M., and Sanchez-Vazquez, F. J. (2007). Influence of constant light and darkness, light intensity, and light spectrum on plasma melatonin rhythms in senegal sole. *Chronobiol Int* 24, 615-627.
- O'Tousa JE, Baehr W, Martin RL, Hirsh J, Pak WL, Applebury ML (1985). The *Drosophila* *ninaE* gene encodes an opsin. *Cell* 40, 839-850.
- O'Tousa, J. E., Leonard, D. S., and Pak, W. L. (1989). Morphological defects in *oraJK84* photoreceptors caused by mutation in *R1-6* opsin gene of *Drosophila*. *J Neurogenet* 6, 41-52.
- Ouyang, Y., Andersson, C. R., Kondo, T., Golden, S. S., Johnson, C. H. (1998). Resonating circadian clocks enhance fitness in cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 8660--8664.
- Pak, W. L., Grossfield, J., and Arnold, K. S. (1970). Mutants of the visual pathway of *Drosophila melanogaster*. *Nature* 227, 518-520.
- Panda, S., Nayak, S. K., Campo, B., Walker, J. R., Hogenesch, J. B., Jegla, T. (2005). Illumination of the melanopsin signaling pathway. *Science* 307: 600--604.
- Peirson, S., and Foster, R. G. (2006). Melanopsin: another way of signaling light. *Neuron* 49, 331-339.

- Peng Y, Stoleru D, Levine JD, Hall JC, Rosbash M (2003) *Drosophila* freerunning rhythms require intercellular communication. *PLoS Biol* 1: E13.
- Pittendrigh, C.S., Bruce V.G., Kaus P. (1958) On the significance of transients in daily rhythms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 44: 965-973.
- Pittendrigh C., Bruce V.G., Rosenzweig N.S., and Rubin M.L. (1959) A biological clock in *Neurospora*. *Nature* 184: 169-170.
- Pittendrigh C and Daan S (1976) A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. I. The stability and lability of spontaneous frequency. *J Comp Physiol* 106:223-252.
- Popp, J. Lichtpräferenz adulter Taufliegen und Beeinflussung des larvalen photophoben Verhaltens durch genetische Faktoren und Ernährungszustand. Zulassungsarbeit, Universität Regensburg, 2007
- Pollock JA and Benzer S (1988) Transcript localization of four opsin genes in the three visual organs of *Drosophila*; RH2 is ocellus specific. *Nature*. 333(6175):779-82.
- Provencio, I., Roderiguez, I. R., Jiang, G., Pär Hayes, W., Moreira, E. F., Rollag, M. D. (2000). A novel human opsin in the inner retina. *J. Neurosci.* 20: 600--605.
- Qiu, X., Kumbalasiri, T., Carison, S. M., Wong, K. Y., Krishna, V., Provencio, I., Berson, D. M. (2005) Induction of photosensitivity by heterologous expression of melanopsin. *Nature AOP* 1--4.
- Renn SCP, Park JH, Rosbash M, Hall JC, Taghert PH (1999) A pdf neuropeptide gene mutation and ablation of PDF neurons each cause severe abnormalities of behavioral circadian rhythms in *Drosophila*. *Cell* 99: 791-802.
- Rieger D, Stanewsky R, Helfrich-Förster C (2003) Cryptochrome, compound eyes, Hofbauer-Buchner eyelets, and ocelli play different roles in the entrainment and masking pathway of the locomotor activity rhythm in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *J Biol Rhythms* 18: 377-391.
- Rieger D, Shafer OT, Tomioka K, Helfrich-Forster C. (2006) Functional analysis of circadian pacemaker neurons in *Drosophila melanogaster*. *J Neurosci* 26(9):2531-43.
- Rieger, D., Fraunholz, C., Popp, J., Bichler, D., Dittmann, R., and Helfrich-Forster, C. (2007). The fruit fly *Drosophila melanogaster* favors dim light and times its activity peaks to early dawn and late dusk. *J Biol Rhythms* 22, 387-399.
- Rosato E, Codd V, Mazzotta G, Piccin A, Zordan M, Costa R and Kyriacou CP (2001) Light-dependent interaction between *Drosophila* CRY and the clock protein PER mediated by the carboxy terminus of CRY. *Curr Biol* 11:909-917.
- Rutila J.E., Suri V., Le M., So V., Rosbash M., Hall J.C. (1998) CYCLE is a second bHLH-PAS clock protein essential for circadian rhythmicity and transcription of *Drosophila* period and timeless. *Cell* 93: 805-14.
- Salcedo, E., Huber, A., Henrich, S., Chadwell, L. V., Chou, W. H., Paulsen, R., and Britt, S. G. (1999). Blue- and green-absorbing visual pigments of *Drosophila*: ectopic

expression and physiological characterization of the R8 photoreceptor cell-specific Rh5 and Rh6 rhodopsins. *J Neurosci* 19, 10716-10726.

Sakamoto, K., Hisatomi, O., Tokunaga, F., and Eguchi, E. (1996). Two opsins from the compound eye of the crab *Hemigrapsus sanguineus*. *J Exp Biol* 199, 441-450.

Sambrook J. and Russel D.W. (2001) *Molecular cloning*, Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Sambrook, J., and Gething, M. J. (1989). Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature* 342, 224-225.

Schneuwly, S., Burg, M. G., Lending, C., Perdew, M. H., and Pak, W. L. (1991). Properties of photoreceptor-specific phospholipase C encoded by the *norpA* gene of *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem* 266, 24314-24319.

Schwemer, J., and Henning, U. (1984). Morphological correlates of visual pigment turnover in photoreceptors of the fly, *Calliphora erythrocephala*. *Cell Tissue Res* 236, 293-303.

Sehgal A Price JL, Man B and MW Young. (1994). Loss of Circadian Behavioral Rhythms in the *Drosophila* Mutant *timeless*. *Science* 263: 1603-1606.

Sekaran, S., Lupi, D., Jones, S. L., Sheely, C. J., Hattar, S., Yau, K. W., Lucas, R. J., Foster, R. G., and Hankins, M. W. (2005). Melanopsin-dependent photoreception provides earliest light detection in the mammalian retina. *Curr Biol* 15, 1099-1107.

Shafer OT, Helfrich-Forster C, Renn SC, Taghert PH. (2006) Reevaluation of *Drosophila melanogaster*'s neuronal circadian pacemakers reveals new neuronal classes. *J Comp Neurol*. 498(2):180-93.

Shafer OT, Rosbash M, Truman JW (2002) Sequential nuclear accumulation of the clock proteins *period* and *timeless* in the pacemaker neurons of *Drosophila melanogaster*. *J Neurosci* 22: 5946-5954.

Slotten, H. A., Krekling, S., and Pevet, P. (2005). Photic and nonphotic effects on the circadian activity rhythm in the diurnal rodent *Arvicanthis ansorgei*. *Behav Brain Res* 165, 91-97.

Smale L, Lee T, Nunez AA (2003) Mammalian diurnality: Some facts and gaps. *J Biol Rhythms* 18:356-366.

Spudich, J. L., Yang, C--S., Jung, K--H., Spudich, E. N. (2000). Retinylidene proteins: structures and functions from archaea to humans. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 16:365--392.

Stanewsky R, Kaneko M, Emery P, Beretta B, Wager-Smith K, Kay SA, Rosbash M and Hall JC (1998) The *cryb* mutation identifies cryptochrome as a circadian photoreceptor in *Drosophila*. *Cell* 95:681-692.

Stoleru D, Peng Y, Agosto J, Rosbash M (2004) Coupled oscillators control morning and evening locomotor behavior of *Drosophila*. *Nature* 431:862-868.

Terakita, A. (2005). The opsins. *Genome Biol* 6, 213.

- Veleri S., Brandes C., Helfrich-Förster C., Hall J.C., and Stanewsky R. (2003) A selfsustaining, light-entrainable circadian oscillator in the *Drosophila* brain. *Curr. Biol.* 13, 1758-1767.
- Veleri, S. (2005) Analysis of the light--entrainment pathways for the circadian clock of *Drosophila melanogaster*, Dissertation, Universität Regensburg.
- Wang, T., and Montell, C. (2005). Rhodopsin formation in *Drosophila* is dependent on the PINTA retinoid-binding protein. *J Neurosci* 25, 5187-5194.
- Wang, T., and Montell, C. (2007). Phototransduction and retinal degeneration in *Drosophila*. *Pflugers Arch* 454, 821-847.
- Wolff T, and Ready DF (1993). Pattern formation in the *Drosophila* retina. In: Bate M, and Arias AM (eds.). *The Development of Drosophila melanogaster*, 1277-1325. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York.
- Wulbeck, C., Szabo, G., Shafer, O. T., Helfrich-Forster, C., and Stanewsky, R. (2005). The novel *Drosophila* *tim*(blind) mutation affects behavioral rhythms but not periodic eclosion. *Geneti Canton S* 169, 751-766.
- Yoshii T, Funada Y, Ibuki-Ishibashi T, Matsumoto A, Tanimura T, Tomioka K (2004) *Drosophila* *cryb* mutation reveals two circadian clocks that drive locomotor rhythm and have different responsiveness to light. *J Insect Physiol* 50:479-488.
- Yoshii, T., Heshiki, Y., Ibuki-Ishibashi, T., Matsumoto, A., Tanimura, T., and Tomioka, K. (2005). Temperature cycles drive *Drosophila* circadian oscillation in constant light that otherwise induces behavioural arrhythmicity. *Eur J Neurosci* 22, 1176-1184.
- Zerr DM, Hall JC, Rosbash M, Siwicki KK (1990) Circadian fluctuations of period protein immunoreactivity in the CNS and the visual system of *Drosophila*. *J Neurosci* 10:2749-2762.
- Zordan, M., Sandrelli, F., and Costa, R. (2003). A concise overview of circadian timing in *Drosophila*. *Front Biosci* 8, d870-877.

## **VIII. Danksagung**

Viele haben zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen- ich kann mich nur herzlich dafür bedanken, und mich entschuldigen, wenn ich nicht alle namentlich nennen kann, oder einige vergesse...

Bei Frau Prof. Charlotte Förster möchte ich mich zuallererst herzlich dafür bedanken, dass Sie trotz stressiger Zeiten sich immer fürsorglich um meine Anliegen bemühte, mir stets ausdauernd mit Rat und Tat zur Seite stand, und mir ermöglichte motiviert kreativ zu arbeiten. Ganz herzlichen Dank Dir, Charlotte!

Besonders möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Stephan Schneuwly bedanken, für sein wertvollen Anregungen und seine Unterstützung im RH7-Projekt! Durch seine Kontakte nach Karlsruhe, zu Joachim Bentrop und Reinhard Paulsen, kam das RH7-Projekt ins Rollen. Vielen Dank auch nach Karlsruhe!

Vielen Dank, dass ich in den „Schneuwly- und Stanewsky-Laboren“ viel Zeit verbringen durfte um molekulare wie histologische Methoden zu erlernen. Diesbezüglich möchte ich mich herzlich bei meinem geduldigen Molekularbiologie-„Vater“ Niki Peschel und meiner PCR-Riesenhilfe Verena Schmeiser bedanken, vielen Dank für Eure Unterstützung! Danke Shobi für die Konstrukte!

Einen großen Dank möchte ich für Pia Gartmeier aussprechen, die meine Fliegen in den ERG's getestet hat und damit auch zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat.

Ein herzliches Dankeschön an die jetzigen und ehemaligen Mitglieder der Arbeitsgruppe Förster, für das freundschaftliche Arbeitsklima und die Hilfsbereitschaft. Vielen Dank Dir, Corinna, Dirk, Eva, Taishi, Verena, Christa, Peter, Silvia.... und Ihnen, Frau Kühn!

Herzlich möchte ich mich bei PD Dr. Alois Hofbauer bedanken fürs Korrekturlesen und die pfundigen Gespräche!

Danke, Juha für die Hilfe beim Formatieren...und PDF-Dokument erstellen!

Für die große Unterstützung und lustigen Stunden möchte ich mich bei Evi, Uschi, Renate, Margot, Flo, Moni, G-Wölfchen....und vielen vielen mehr bedanken!

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken. Danke für Eure immerwährende Unterstützung und Förderung. Vielen Dank, liebe Mutter, für den Rückhalt auch in schwierigen Zeiten.

Ein herzliches Dankeschön geht natürlich auch an Elke, für Ihre Geduld und Ihre Unterstützung

## ***IX. Erklärung***

Hiermit erkläre ich, diese Dissertation selbstständig angefertigt und dabei keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen benutzt zu haben. Alle aus der Literatur entnommenen Daten und Abbildungen sind als solche gekennzeichnet. Die hier vorliegende Dissertation wurde weder vollständig noch teilweise einer anderen Fakultät vorgelegt.

Regensburg, 01.04.2008

Wolfgang Bachleitner